

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas



Tesis

**ESPECIES DE *Pseudomonas* EN EL AIRE DE LA CIUDAD DE PIURA,
PERÚ, ENTRE MARZO Y SEPTIEMBRE DEL 2017**

Presentada por:

Br. Neftali Juvenal Pintado Camacho

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

Línea de investigación: Salud Pública

Piura, Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

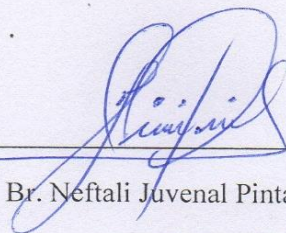
Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

TESIS

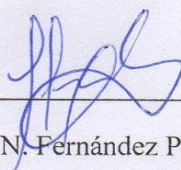
**ESPECIES DE *Pseudomonas* EN EL AIRE DE LA CIUDAD DE PIURA,
PERÚ, ENTRE MARZO Y SEPTIEMBRE DEL 2017**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA.



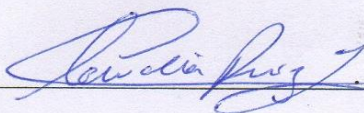
Br. Neftali Juvenal Pintado Camacho.

EJECUTOR DE TESIS



Mclgo. Jaime N. Fernández Ponce, M. Sc.

ASESOR



Blgo. Claudia del Pilar Ruiz González, M. Sc.

CO- ASESOR

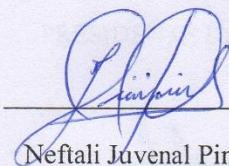
DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **Neftali Juvenal Pintado Camacho**, identificado con DNI N° **48045331**, Bachiller de Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **Caserío El CUCHO** del Distrito **SULLANA**, Provincia **SULLANA**, Departamento **PIURA**. Celular: **978331239**. Email: **neftalijuvenalpintadobio@hotmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario, de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 03 de septiembre de 2019



Neftali Juvenal Pintado Camacho

DNI N° 48045331

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-

2016-SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

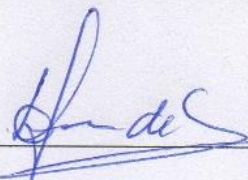
Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

TESIS

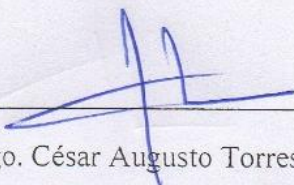
ESPECIES DE *Pseudomonas* EN EL AIRE DE LA CIUDAD DE PIURA,
PERÚ, ENTRE MARZO Y SEPTIEMBRE DEL 2017

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA



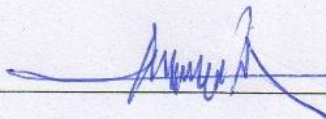
Mchlgo. María Dorothy Torres Gallo, M.Sc.

PRESIDENTE DE JURADO



Mchlgo. César Augusto Torres Díaz, M. Sc

SECRETARIO DE JURADO



Dr. Carlos Enrique Holguín Mauricci

VOCAL DE JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 059 - 2019-UI-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "ESPECIES DE *Pseudomonas* EN EL AIRE DE LA CIUDAD DE PIURA, PERÚ, ENTRE MARZO Y SETIEMBRE DEL 2017", presentada por el señor Bachiller **NEFTALI JUVENAL PINTADO CAMACHO**, con el asesoramiento del **Mchlgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce, MS.c.** y co-asesor **Blgo. Claudia del Pilar Ruiz González, MS.c.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADO (X)

DESAPROBADO ()

Con la mención de:

MUY BUENA

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 23 de setiembre de 2019.

UNP

[Signature]
Mchlgo. MARIA DOROTHY TORRES GALLO, MS.c.
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

[Signature]
Mchlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MS.c.
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

[Signature]
Dr. CARLOS ENRIQUE HOLGUÍN MAURICCI
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

DEDICATORIA

Para dos grandes fuerzas que siempre me acompañan y son guías en mi vida, Dios y mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Estos últimos años han significado para mí una fortaleza de superación a mí mismo e ir reafirmando mi vocación por la investigación. Tener la oportunidad de conocer hombres y mujeres que te llenen de experiencias positivas que, a veces, bastó tan solo una conversación, me hayan ayudado mucho crecer como persona y servido de soporte en la realización de este proyecto. Por ello dedico estas líneas para agradecer, pues no quiero dejar a nadie fuera y deseo que mis agradecimientos sean justos y como se merecen.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su amor incondicional y a los que grandemente les debo haber llegado aquí, ellos que han estado acompañándome, comprendiéndome cada día y lo seguirán haciendo en este complejo camino de la vida.

A mis maestros, asesores y amigos, Jaime Fernández Ponce y Claudia del Pilar Ruiz González, grandes personas, a quienes he de agradecer la oportunidad que me dieron abriéndome las puertas a este laboratorio y brindarme toda su confianza, asimismo, por haberse embarcado conmigo en este proyecto, por compartir su amplio conocimiento. Además, su completa disposición para apoyarme en lo que sea necesario.

A los profesores de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, por brindarme su conocimiento, experiencias y buen trato en la formación de pregrado, lo cual ha ayudado en mi crecimiento profesional. A Dorothy Torres de Leon, Cesar Torres Díaz y Carlos Enrique Holguín Mauricci, les agradezco por el aporte de hacer mejorar este trabajo y que además cumplan la tarea de evaluar mi defensa de tesis.

A una gran persona, buen amigo, el Sr. Carlos Domínguez Jiménez técnico del laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, por brindarme su confianza, su amabilidad y su paciencia haciendo muy cálida mi permanencia, igualmente a José Martin Viera Medina, técnico del laboratorio de Microbiología, por apoyarme y compartir su conocimiento.

A mis compañeros de laboratorio, amigos y futuros colegas, Jhonathan Delgado, Katty Michilot, Fiorella Campos, Gladys Cobeñas, Joselyn Ipanaque, Nadia Campoverde, Lucia Lozada, Arthurt Panta, Yessenia Valdiviezo, Silvana Palacios, Gabriel Mendoza, Romella Curay, Mari Pinedo, Carlos Soto y Denys Villarreal quienes han sido una gran ayuda y apoyo, con los que he compartido y espero seguir compartiendo buenas vivencias.

Por supuesto, a mis amigos de Promoción de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, en particular a José Escobar, Johana García, Lupe Benavente, Priscila Valdiviezo, Celeste Távara, Treyci, Antony Herrera, Carlos Reyes, Robinson Troncos, Xiomara Zegarra, Christian Pangalima, Claudia Quintana, Brenda Nunura y Jorge Román, por haberme acogido y compartido muchas experiencias llenas de alegría y algunas otras tristezas, viajes, reuniones, amanecidas y por siempre desearme lo mejor.

¡Muchas gracias a todos!

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE GRAFICOS.....	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	V
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA.....	10
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	10
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.	11
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
1.4. OBJETIVOS.	13
1.4.1. Objetivo general.	13
1.4.2. Objetivos específicos.....	13
1.5. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.	13
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	14
2.1. ANTECEDENTES:.....	14
2.1.1. Antecedentes mundiales.....	14
2.1.2. Antecedentes en América.....	15
2.1.3. Antecedentes en Perú.	16
2.2. BASES TEÓRICAS.....	17
2.2.1. Aerobiología.....	17
2.2.2. Bacterias en la atmósfera.....	18
2.2.3. Etimología de <i>Pseudomonas</i>	19
2.2.4. Definición de <i>Pseudomonas</i>	19

2.2.5. Evolución de <i>Pseudomonas</i>	21
2.2.6. Características genotípicas de <i>Pseudomonas</i>	22
2.2.7. Ecología de <i>Pseudomonas</i>	22
2.2.8. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	24
2.2.9. Taxonomía del género <i>Pseudomonas</i>	25
2.4. HIPÓTESIS.....	29
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	30
3.1. ENFOQUE Y DISEÑO.....	30
3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN.	30
3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. RESULTADOS.....	45
4.2. DISCUSIÓN.	49
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4. 1. Especies del género <i>Pseudomonas</i> aisladas e identificadas en el aire exterior de la ciudad de Piura.	45
Tabla 4. 2. Media, mediana y moda de la temperatura, humedad relativa, nivel de iluminación y velocidad del viento.	48

ÍNDICE DE GRAFICOS

Grafico 4. 1. Porcentajes de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas aisladas del aire exterior de la ciudad de Piura.	46
Gráfico 4. 2. Porcentaje de la frecuencia de cepas de <i>Pseudomonas</i> en el aire exterior de la ciudad de Piura.	47
Grafico 4.3. Frecuencia de <i>Pseudomonas</i> en el grupo de bacterias bacilos Gram negativos.....	47
Grafico 4. 8. El número de cepas bacterianas del aire exterior en relación con el parámetro ambiental nivel de iluminación.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Bacterias en la atmósfera.....	62
Anexo 2. Interpretación de la prueba oxidación/fermentación.	63
Anexo 3. Porcentajes de Pseudomonas.....	63
Anexo 4. Distribución de las UFC/ m ³ por mes y lugar en el aire de la ciudad de Piura.....	64
Anexo 5. Datos ambientales que se tomaron durante el muestreo.....	66
Anexo 6. Identificación bioquímica de Pseudomonas.	68
Anexo 7. Otras especies de bacterias identificadas en el aire de Piura.	70
Anexo 8. Confirmación de la identificación bioquímica a través del MicroScan.....	70
Anexo 9. Fotografías.....	71

RESUMEN

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativas no fermentadores de carbohidratos con una amplia distribución en el ambiente, el objetivo de este trabajo fue identificar especies de *Pseudomonas* del aire de tres puntos de la ciudad de Piura, Perú; provenientes de muestras (cepas) almacenadas en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Nacional de Piura, obtenidas con muestreador de aire microbiológico (método filtración e impactación) en placas de Petri con agar TSA y agar sangre durante tres turnos diarios, eligiendo un día aleatorio por semana, entre marzo y septiembre de 2017, en los exteriores del Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) y Municipalidad Provincial de Piura. Las cepas aisladas y almacenadas fueron determinadas a través de pruebas bioquímicas en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de Piura. Se identificaron cinco especies de *Pseudomonas*: *P. aueruginosa*, *P. oryzihabitans*, *P. cichorii*, *P. putida* biovar A y *P. stutzeri*, que representó el 0.57 % (9 cepas) de 88 bacilos Gram negativos de 1586 cepas. Los promedios de parámetros ambientales, temperatura del aire fue 27 °C, humedad relativa 61.4 %, nivel de iluminación 3266 lux y velocidad del viento 0.8 m/s. Así mismo, se conservaron las cepas identificadas en crioviales de BHI con glicerol al 15%, a una temperatura de -11 °C. Es el primer reporte de presencia de *Pseudomonas* en el aire de la ciudad de Piura – Perú, siendo una iniciativa para profundizar la investigación de otros grupos bacterianos en este ambiente.

Palabras clave: *Pseudomonas*, Piura, aerobacterias, identificación bioquímica.

ABSTRACT

Pseudomonas are Gram-negative rods non-fermenting carbohydrates with a wide distribution in the environment, the objective of this work was to identify species of *Pseudomonas* from the air of three points of the city of Piura, Peru; from samples (strains) stored in the Biochemistry and Biotechnology laboratory of the National University of Piura, obtained with microbiological air sampler (filtration and impact method) in Petri dishes with TSA agar and blood agar for three daily shifts, choosing a random day per week, between March and September 2017, outside the Micaela Bastidas Health Center, Recreational Center of Civil Construction of Peru (CONAFOVICER) and Provincial Municipality of Piura. The isolated and stored strains were determined through biochemical tests in the Biochemistry and Biotechnology laboratory of the Professional School of Biological Sciences at the National University of Piura. Five species of *Pseudomonas* were identified: *P. aeruginosa*, *P. oryzihabitans*, *P. cichorii*, *P. putida biovar A* and *P. stutzeri*, which represented 0.57% (9 strains) of 88 gram-negative bacilli of 1586 strains. The average environmental parameters, the air temperature was 27 ° C, relative humidity 61.4%, lighting level 3266 lux and wind speed 0.8 m / s. Likewise, the strains identified in cryovials of BHI were preserved with 15% glycerol, at a temperature of -11 ° C. It is the first report of the presence of *Pseudomonas* in the air of the city of Piura - Peru, is an initiative to deepen the investigation of other bacterial groups in this environment.

Key word: *Pseudomonas*, Piura, aerobacteria, biochemical identification.

INTRODUCCIÓN

El aire limpio es uno de los requisitos básicos de la salud y del bienestar humano. Sin embargo, la contaminación atmosférica sigue siendo una importante amenaza para la salud en todo el mundo. Según una evaluación de la carga de morbilidad debida a la contaminación atmosférica realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se producen más de 2 millones de muertes prematuras atribuibles a los efectos de la contaminación atmosférica y algunos contaminantes del aire en exteriores. Se cree que para América Latina y el Caribe, 35.000 muertes se deberían a la contaminación del aire cada año, pero la cifra real puede ser más alta (Carvajal, 2016).

La evaluación microbiana de la atmósfera ha atraído cierta atención en las últimas décadas debido a que parte de la población vive en el aire, conocida colectivamente como aeroplancton, puede potencialmente ser alergénica o inmunotóxica. Sin embargo, el número de estudios publicados sobre la contaminación por hongos o el muestreo de aire bacteriano en las zonas urbanas es bastante escaso. Los microorganismos sobreviven pobremente en este ambiente. Pero, más de 10.000 litros de aire son inhalados diariamente por un adulto humano. Por lo tanto, la exposición a agentes microbianos en el aire a menudo puede resultar en infecciones respiratorias y otros efectos adversos para la salud relacionados con trastornos de hipersensibilidad (Soto, Lozano, Soler, Cansado, & Gapto, 2009).

Los microorganismos dispersados por el aire tienen una gran importancia biológica y económica. Producen enfermedades en plantas, animales y humanos, causan alteración de alimentos y materiales orgánicos y contribuyen al deterioro y corrosión de monumentos y metales (De la Rosa, Mosso, & Ullán, 2002).

De otro lado, *Pseudomonas* es posiblemente uno de los géneros bacterianos más fascinantes y ecológicamente significativos. El género está ampliamente distribuido en la naturaleza y abarca muchos hábitats diferentes, colonizando suelo, agua, plantas y animales (Sánchez, 2013). El interés

de estas bacterias se ha reflejado en el gran número de publicaciones de investigación originales, revisiones y libros sobre este tema (Alanís & Guerrero, 2004).

En Piura no existen reportes de identificación de bacterias en el aire exterior. En vista de esta situación, se desarrolló la presente investigación para indagar la presencia de especies de *Pseudomonas* en muestras de aire de tres puntos de la ciudad de Piura, Perú. Las muestras fueron tomadas por el método de impactación sobre medios específicos para el aislamiento de estos microorganismos. Luego, se identificó las cepas sospechosas por técnicas bioquímicas y se procedió a calcular las frecuencias correspondientes.

En el aire exterior de tres puntos de la ciudad de Piura se encontró *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida* biovar A y *Pseudomonas stutzeri*; las cepas están conservadas en crioviales con caldo BHI y glicerol al 15% en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Nacional de Piura.

CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.

El estudio de los microorganismos en el aire está en desarrollo y es un campo que necesita más exploración. La importancia de su estudio se justifica al reafirmar que estos microbios puedan ser agentes de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) (Carvajal, 2016). Para conocer información sobre los microbios en el aire países como España, Colombia y México han formado redes de monitoreo del aire. En Perú existe vacío de información sobre los microorganismos en aire. Con los problemas de la contaminación atmosférica es de mucho interés la investigación científica en estos temas que permitan tomar decisiones que mejoren las condiciones de higiene industrial y mejoren la calidad de vida de la población.

Según una evaluación de la carga de morbilidad debida a la contaminación atmosférica realizada por la OMS, cada año se producen más de dos millones de muertes prematuras atribuibles a los efectos de la contaminación atmosférica y algunos contaminantes del aire en exteriores. En 2005, según el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS), para América Latina y el Caribe, 35.000 muertes se atribuyen a la contaminación del aire cada año, pero la cifra real puede ser más alta (Carvajal, 2016).

Los aerosoles biológicos pueden ser considerados un riesgo potencial para el hombre por su patogenicidad, especialmente cuando éstos encuentran una vía de entrada al organismo; por tal motivo, determinar la exposición humana a dichos contaminantes se ha convertido en un problema importante, sobre todo en zonas donde el riesgo biológico es elevado, porque pueden causar infecciones, alergias o incluso intoxicaciones a las personas expuesto a ellos (Carvajal, 2016).

Existen infecciones humanas y animales que se transmiten por el aire y causan enfermedad, principalmente, en el aparato respiratorio. Las enfermedades respiratorias tienen una gran importancia socioeconómica ya que se transmiten fácilmente a través de las actividades cotidianas del hombre, son

las más frecuentes en la comunidad y el motivo más importante de ausentismo laboral y escolar. (Montero, 2012). No hay que olvidar que una persona, a lo largo de su vida, respira varios millones de m³ de aire que contiene polvo, vapor de agua y microorganismos (De la Rosa, Mosso, & Ullán, 2002). Asimismo, en la atmósfera la concentración de microorganismos es regulada naturalmente por el grado de humedad, temperatura, velocidad de aire, tamaño y nivel de partículas de polvo entre los factores conocidos (Ruiz, y otros, 2017). Además, *Pseudomonas aeruginosa* se adapta a las vías respiratorias de los humanos y sigue siendo su localización más frecuente (Montero, 2012).

La OMS considera a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* como una de las 12 familias bacterianas de mucha peligrosidad para el humano, considerándolas en el nivel crítico, de acuerdo al grado de severidad de las infecciones que causan, la facilidad con que se propagan y cuantos antibióticos quedan para hacerles frente (OMS, 2017); asimismo, la OMS considera como unos de los principales retos para el 2019 la contaminación del aire y la resistencia a los antimicrobianos (OPS, 2019).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Qué especies de *Pseudomonas* existen en el aire de la ciudad de Piura, Perú entre marzo y septiembre del 2017?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.

Pseudomonas es importante en biorremediación, biotecnología, industria, agricultura, veterinaria y medicina en el mundo. Especies de este género han sido aisladas de muestras de suelo, agua y en ambientes interiores.

Sin embargo, no existen reportes de las especies de *Pseudomonas* en el aire exterior, tanto en Perú como en Piura. El conocimiento de la presencia de microorganismos de este género en el aire debería llevar a tomar precauciones en el campo de la salud humana y en veterinaria.

Así mismo, ya que estas cepas están preservadas en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Nacional de Piura, podrán ser utilizadas en investigaciones de estudiantes y científicos, para describir o aplicar sus propiedades desde diferentes puntos de vista, tales como la biotecnología, agricultura, medicina humana, veterinaria y microbiología ambiental, entre otros.

Es bueno recordar, además, que algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. putida* y *P. stutzeri* causan variados problemas de salud en humanos, como en los oídos, los ojos, la piel, vías respiratorias, los huesos, la sangre, los pulmones, las heridas, enfermedades graves, potencialmente mortales; además, los microorganismos de este tipo presentan una alta resistencia antimicrobiana.

De otro lado, estos microorganismos a través de las corrientes de aire pueden desplazarse a grandes distancias, llegando a causar problemas en zonas distintas y alejadas de una ciudad, como áreas de cultivo, reduciendo la producción de alimentos o causando la muerte de plantas; asimismo puede afectar a cultivos ornamentales en áreas verdes de las ciudades y también producir la corrosión de monumentos y metales.

1.4. OBJETIVOS.

1.4.1. Objetivo general.

Determinar especies de *Pseudomonas* en el aire de la ciudad de Piura, Perú entre marzo y septiembre del 2017.

1.4.2. Objetivos específicos.

- Identificar *Pseudomonas* por pruebas bioquímicas de los cultivos puros bacterianos de morfología bacilar procedentes de muestras bacterianas del aire de la ciudad de Piura conservadas en el laboratorio de bioquímica de la Universidad Nacional de Piura.
- Obtener datos ambientales de los muestreos realizados entre marzo y setiembre del 2017, de los tres puntos exteriores al Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) y Municipalidad Provincial de Piura
- Iniciación de un cepario con especies de *Pseudomonas*.

1.5. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

Las muestras de aire se colectaron durante los meses de marzo a septiembre del 2017 en tres zonas de la ciudad de Piura, Perú, en los exteriores del Centro de Salud Micaela Bastidas (5°10'42.8"S 80°40'35.6"W), Centro Recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) (5°11'01.0"S 80°38'16.4"W) y de la Municipalidad Provincial de Piura (5°11'51.0"S 80°37'37.1"W), que están comprendidos en el plan de acción del aire de la ciudad de Piura (GESTA PIURA) propuesto por el Ministerio del Ambiente del Perú (MINAM, 2010). La identificación se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Piura.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES:

2.1.1. Antecedentes mundiales.

En el aire de Amravati, India, se encontró *Pseudomonas aeruginosa*, además de otras especies bacterianas (Kulkarni, 2017), mientras que en Arabia Saudita se identificó *Pseudomonas saudimassiliensis*, nueva especie, aislada de muestras de aire del entorno urbano de la ciudad de Makkah, llamada cepa 12M76_air^T (Azhar, y otros, 2017). En tanto, en la Antártida los géneros bacterianos encontrados en muestras de aire fueron *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* y *Pseudomonas* (Pearce, y otros, 2009).

En Marsella, Francia, se demostró que el número de bacterias se incrementaba con la temperatura y la velocidad del viento, en particular bacterias Gram negativas, sobre todo en el área urbana (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). En cambio, en Málaga, España, en el aire de la cueva de Ardales se encontraron *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas xanthomarina*. *Pseudomonas stutzeri* se identificó en el muestreo de otoño. Esta misma especie se mostró previamente en las cuevas de la Graja, Castañar de Ibor, Lascaux, Altamira, y en la Cova des Pas de Vallgornera (Domínguez, 2014).

También en España, en el aire de la Gruta de las Maravillas se encontró *Pseudomonas stutzeri*, *P. tremae*, *P. simae* y *P. jessenii*. *P. stutzeri* fue la más común. Igualmente, en el aire de la Cueva el Tesoro, se halló *P. oryzihabitans*, *P. koreensis*, *P. psychrotolerans*, *P. kuykendallii* y *P. xanthomarina*; en el exterior de la cueva se aisló *P. mediterránea* y *P. congelans* (Domínguez, 2014).

En Aragón (España), en el aire de exteriores de la ciudad, se aislaron con un muestreador Surface Air System (S.A.S.) *Staphylococcus* y *Bacillus*, entre las bacterias Gram positivas, mientras que entre las Gram negativas se encontraron *Alcaligenes* y *Acinetobacter* (Amigot, y otros, 2000),

bacilos Gram negativos no fermentadores. Se debe resaltar que *Acinetobacter* pertenece al orden *Pseudomonadales* (Garrity, Brenner, Kreig, & Staley, 2005).

La carga microbiana del aire de la ciudad de Murcia, España, se analizó periódicamente a lo largo de un año en diez zonas diferentes. La recogida de muestras se dio por el método de impactación; así, en la caracterización bioquímica se determinó *Pseudomonas*, además de *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium* (Soto, Lozano, Soler, Cansado, & Gápto, 2009).

A nivel mundial, se estima que entre 3 y 5 % de todas las infecciones bacterianas, y hasta 28 a 38 % de las bacteriemias causadas por microorganismos Gram negativos, son causadas por *P. aeruginosa*, con tasas de incidencia de 4,7 casos por 100.000 personas al año, especialmente en países en desarrollo (Valderrama, y otros, 2016).

2.1.2. Antecedentes en América

En EE.UU. se midió la abundancia y diversidad de bacterias y hongos en el aire; se tomaron muestras en el observatorio Bachelor (ubicado a 2,7 km sobre el nivel del mar) y se recuperó *Pseudomonas frederiksbergensis* así como bacterias Gram positivas capaces de formar endosporas (Smith, Griffin, Jaffe, & Schuerger, 2012).

En Monterrey, México, se determinó la concentración y tipo de microorganismos suspendidos en la atmósfera de nueve sitios de la ciudad; se aislaron *Pseudomonas aeruginosa* y cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* (Cruz & Jiménez, 2006). También en México, en Aguascalientes, en el relleno sanitario “San Nicolás” y en los alrededores del Municipio de Aguas Calientes, se aislaron e identificaron 21 especies de bacterias en el aire. Se calculó 53 UFC/m³ de *Pseudomonas fluorescens*, con una frecuencia del 50%; *Pseudomonas putida* se halló con una densidad de 12 UFC/m³ y una frecuencia de 8% (Flores, Maricela, & Valenzuela, 2007).

En Ciudad de México, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) pudo comprobarse la importancia de las infecciones nosocomiales, en particular de las neumonías del paciente hospitalizado, especialmente las producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, dada la alta mortalidad con la que se asocian (Farías, Medina, & Chavarría, 2005) . Las infecciones respiratorias agudas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* van en aumento en pacientes VIH positivos (Pérez, Cabrera, Batlle, & Estévez, 2002).

En Colombia, aproximadamente 4,9 % de las bacteriemias son originadas por *P. aeruginosa* (Valderrama, y otros, 2016). Además, en Bogotá, Colombia, la caracterización microbiológica del aire en la localidad de Puente Aranda, reportó varios microorganismos dentro de ellos *Pseudomonas sp*; así mismo, en los puntos Colegio La Merced, Parque Puente Aranda y Parque Cundinamarca se identificó *Pseudomona aeruginosa* (Rey & Fula, 2005). En esta misma localidad en el 2009 lograron identificar 37 especies bacterianas siendo una de ellas *Pseudomona aeruginosa*, de los bioaerosoles relacionados con factores meteorológicos y material particulado (Álvarez & Mesa, 2009).

2.1.3. Antecedentes en Perú.

En Piura, Perú, entre diciembre del 2016 y mayo del 2017 se realizó un estudio de recuento de la carga de bacterias aerobias mesófilas, captadas mediante el método de impactación con un equipo muestreador de aire ECO-MAS 100. Durante el mes de diciembre se registró el valor más bajo en el recuento total con $1.1 \times 10^3 \text{ UFC/m}^3$ en la Municipalidad Provincial de Piura y el más alto en el mes de mayo con $5.6 \times 10^3 \text{ UFC/m}^3$ en la Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental (DESA) (Ruiz, y otros, 2017).

2.2. BASES TEÓRICAS.

2.2.1. Aerobiología.

La dispersión aérea de partículas biológicas ha suscitado el interés de muchos científicos a lo largo de la historia. Charles Darwin, en el siglo XIX, realizó estudios de muestras de polvo que tomó a bordo del H.M.S. Beagle, durante la travesía por la costa noroeste africana, observando partículas bióticas de origen continental. Louis Pasteur, también en siglo XIX, puso fin a la teoría de la generación espontánea con sus estudios sobre los gérmenes transportados por el aire. En 1860 realizó una serie de experimentos a partir de los cuales se asentaron la mayoría de los principios de la aerobiología: la necesidad de un muestreo volumétrico, la heterogeneidad de las esporas del aire y las vías del proceso aerobiológico (liberación, dispersión y deposición). Concluyó que las partículas presentes en el aire variaban en función de las condiciones climáticas, la altitud, la localidad y el momento del día. Pasteur consideró importante comparar las diferentes estaciones del año en el mismo lugar y distintos sitios en el mismo período. Esto marcó el camino para las investigaciones del bacteriólogo Pierre Miquel (1850-1922), el cual es considerado el primer aerobiólogo profesional, quien encontró diferencias en el contenido de partículas biológicas en el aire según la estación, la altitud y la hora del día (Domínguez, 2014).

En la década de 1930, Fred C. Meier propuso el término aerobiología para hacer referencia a los estudios que se desarrollaban sobre los granos de polen, las esporas fúngicas y las bacterias presentes en la atmósfera. Meier particularmente estaba interesado en estudiar la dispersión aérea de las esporas de hongos. A partir de 1950 comienza a crecer el interés por la aerobiología y se desarrollan la mayoría de métodos y aparatos de muestreo. Posteriormente, Pathirane en 1975, consideró la aerobiología como una ciencia multidisciplinar que comprende la liberación, retención, dispersión, deposición e incidencia atmosférica de esporas, pólenes y otros microorganismos aerovagantes (Domínguez, 2014).

En 1998, la *International Association of Aerobiology* (IAA) definió la aerobiología como una disciplina científica enfocada al estudio del transporte pasivo de organismos y partículas de origen biológico a través de la atmósfera. Estas partículas aerovagantes comprenden diferentes organismos y sus productos, incluyendo virus, células, esporas de bacterias y hongos, metabolitos asociados (como endotoxinas y micotoxinas), esporas de briofitas y pteridofitas, polen de plantas superiores, ácaros, insectos, etc. (Domínguez, 2014)

2.2.2. Bacterias en la atmósfera.

En la década de los años sesenta y debido al lanzamiento de satélites y naves al espacio, la NASA (National Aeronautics and Space Administration) promovió un programa para el estudio de los microorganismos de la estratosfera y del espacio. El objetivo era mantener la esterilidad de los aparatos para evitar la contaminación de la atmósfera, determinar la supervivencia de los microorganismos en las condiciones del espacio y conocer la posible existencia de microorganismos extraterrestres capaces de transmitir vida entre planetas. La NASA realizó varias investigaciones en condiciones de laboratorio sobre el efecto de las radiaciones ultravioletas y el alto vacío sobre la viabilidad de las esporas microbianas demostrando que no eran destruidas. También se realizaron estudios en satélites y naves en vuelo donde concluyeron que las condiciones del espacio no causan la total inactivación de la micropoblación terrestre (De la Rosa, Mosso, & Ullán, 2002).

La tropósfera contiene aproximadamente el 80% de la masa total de gas en la atmósfera y el 50% de esta masa se ubica a menos de 5 km. Esta capa, por lo tanto, contiene gran parte de la vida microbiana asociada con la atmósfera (Anexo 1). Los microorganismos también se han aislado de la estratósfera. Los aislados estratosféricos incluyen *Bacillus simplex* y *Staphylococcus pasteurii*, aisladas a una altitud de 41 km y un único hongo, *Engyodontium album*. Incluso, se han encontrado bacterias a 70 km sobre la superficie de la tierra usando cohetes de gran altura. La división de dichos microorganismos entre diferentes segmentos verticales podría resultar de los límites térmicos y las

zonas de amortiguamiento delgadas (o pausas), por ejemplo, la tropopausa, el límite entre la tropósfera y la estratósfera (Pearce, y otros, 2009).

2.2.3. Etimología de *Pseudomonas*.

Pseudomonas deriva del griego ψευδης, pseudós, “falso”, y μονος, monos, “único” o “unidad”, es decir, “unidades falsas”. En 1894, el botánico alemán Walter Migula acuñó el término *Pseudomonas* para un género de bacterias, aunque nunca aclaró el significado del término. Su especie más relevante es *Pseudomonas aeruginosa* (cuyo término de especie proviene del latín *aerugo*, “óxido de cobre”, y *osus*, adjetivo que indica una abundancia), llamada así por el color azul verdoso de las colonias bacterianas. Esta bacteria causa infecciones graves dentro de los hospitales (Camacho, 2013).

2.2.4. Definición de *Pseudomonas*.

Las bacterias del género *Pseudomonas* se definen como bacilos rectos o ligeramente curvados, de 0.5-1.0 µm de diámetro por 1.5 – 5.0 µm de longitud. Son Gram negativo, móviles por uno o varios flagelos polares. Las especies de *Pseudomonas* son aeróbicas, tienen un tipo de metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno como aceptor de electrones terminal; en algunos casos pueden utilizar el nitrato como un aceptor de electrones alternativo, lo que permite que el crecimiento se produzca de forma anaeróbica. Todas las cepas son quimioorganotróficas. La reacción de oxidasa es positiva o negativa y la catalasa siempre es positiva. No son tolerantes a condiciones ácidas y no pueden crecer a un pH inferior a 4.5. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Algunas especies son patógenas de animales o plantas (Sánchez, 2013).

Las secciones delgadas de las células de *Pseudomonas* muestran las paredes celulares y las características de la membrana de las bacterias Gram negativas. Típicamente las células de *Pseudomonas* tienen flagelos polares. La inserción de flagelo en algunos casos no es exactamente polar sino subpolar, y ocasionalmente puede ser difícil diferenciarlo del llamado tipo peritricos

observado en miembros de otros géneros. Además del flagelo polar, las cepas de algunas especies (*P. mendocina* y *P. stutzeri*) pueden producir flagelos laterales de longitud corta. Se han notificado fimbrias (pili) de inserción polar para *P. aeruginosa* y *P. alcaligenes* en los primeros estudios de Fuerst y Hayward en 1969 (Sánchez, 2013).

Un carácter morfológico que se usó para diferenciar miembros del género *Pseudomonas* de otras *Pseudomonas* aeróbicas fue la incapacidad de los primeros para acumular gránulos endocelulares de poli- β - hidroxibutirato cuando crecían en medios de bajo contenido de nitrógeno en diversas fuentes de carbono. Los primeros caracteres taxonómicos del género *Pseudomonas* incluyeron la pigmentación como un carácter genérico, pero esto ya no es válido (Sánchez, 2013).

Seis pigmentos son producidos por *P. aeruginosa* y otras especies de *Pseudomonas* fluorescentes: cuatro fenazinas (piocianina, pirenubina, clorofina, oxifenazina), la proteína azul de *Pseudomonas*, y pioverdina. Varios pigmentos de fenazina pueden ser producidos por una única cepa (Sánchez, 2013).

Las pioverdinas también son fisiológicamente importantes porque funcionan como sideróforos eficientes. Además de las pioverdinas, las *Pseudomonas* fluorescentes también producen otros sideróforos específicos de la cepa, pero químicamente relacionados, llamados pseudobactina y pioquelin (no pigmentados). Los sideróforos son compuestos que captan el hierro. *Pseudomonas spp.* (como *P. fragi* y *P. mendocina*) no producen sideróforos en cantidades detectables y son muy sensibles a las condiciones limitantes de hierro (Sánchez, 2013).

Las cepas de las especies de *Pseudomonas* pueden crecer en medios mínimos definidos químicamente con iones de amonio o nitrato como fuente de nitrógeno y un solo compuesto orgánico como única fuente de carbono y energía. La mejor temperatura de crecimiento de la mayoría de cepas es de aproximadamente 28 °C; algunas especies pueden crecer a un ritmo considerable a 4 °C y, por lo tanto, pueden considerarse psicrotróficas. Otras crecen a una temperatura máxima de

aproximadamente 45 °C y, por lo tanto, no son verdaderos termófilos. Ninguno de los miembros del género tolera condiciones ácidas y el crecimiento es invariablemente negativo con un pH de 4.5 (Sánchez, 2013).

El metabolismo de *Pseudomonas* es típicamente respiratorio con oxígeno como aceptor de electrones terminal, pero algunas especies también pueden usar nitrato como aceptor de electrones alternativo y pueden llevar a cabo una desnitrificación repressiva (reducción disimilatoria del nitrato a óxido nítrico (N₂O) o nitrógeno gaseoso (N₂)). En la mayoría de los casos la desnitrificación es propiedad de todos los miembros de una especie determinada, y solo unas pocas cepas pueden ser capaces de desnitrificar (Sánchez, 2013).

Pseudomonas son conocidos por su capacidad de degradación aeróbica de una serie de hidrocarburos, compuestos aromáticos y sus derivados, de los cuales existen compuestos naturales y productos finales o intermedios de actividades industriales. Uno de los aspectos que ha atraído la atención de bioquímicos y bacteriológicos durante muchos años es la utilización de la arginina por las *Pseudomonas*. El sistema de la arginina dihidrolasa ha sido utilizado por taxonomistas para la diferenciación de especies, pero no todas las cepas de *Pseudomonas* tienen este sistema y está presente en otros géneros (Sánchez, 2013).

2.2.5. Evolución de *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* es uno de los más diversos y su taxonomía ha sufrido muchos cambios desde su descubrimiento. La taxonomía de *Pseudomonas*, así como los métodos de identificación, han evolucionado junto con las metodologías disponibles. El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula en 1895, de acuerdo con sus características morfológicas. Durante muchos años, el género colocó muchas especies, no siempre bien caracterizadas, hasta el trabajo de Stanier, Doudoroff y Palleroni en el que las propiedades fisiológicas y bioquímicas establecieron claramente la base taxonómica y la identificación de la especie (Sánchez, 2013).

El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más complejos. Por ahora, *Pseudomonas* es el género de bacterias Gram negativas con el mayor número de especies: 142 especies y subespecies. Con nuevas investigaciones y mejores técnicas de identificación el número de especies tiende a crecer continuamente (Sánchez, 2013).

2.2.6. Características genotípicas de *Pseudomonas*.

El genoma de *Pseudomonas* es un cromosoma circular de ADN de doble cadena, con un tamaño de 4.5-7 Mbp. El contenido mol% G+C es 58-69. El genoma más grande es el genoma de *P. fluorescens* Pf -5 (con 7074893 bp) y el genoma de *P. stutzeri* A1501 es el más pequeño (con 4567418 pb) (Sánchez, 2013).

Los plásmidos son componentes importantes de la composición genética de *Pseudomonas*. Algunos de ellos actúan como factores de fertilidad, otros pueden impartir resistencia a diversos agentes (como, por ejemplo, antibióticos) y otros confieren la capacidad de degradación de fuentes de carbono inusuales, lo que contribuye a la versatilidad nutricional que es una característica sorprendente de muchos miembros del género (Sánchez, 2013).

2.2.7. Ecología de *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* es posiblemente uno de los géneros bacterianos más fascinantes y ecológicamente significativos. Las cepas de *Pseudomonas* son bacterias ambientales importantes en el reciclaje de nutrientes, pero también en medicina y biotecnología. Dos características interrelacionadas están presentes en el género *Pseudomonas*: su alto número de especies y su ubicuidad. En consecuencia, a esta distribución universal se debe esperar un grado notable de adaptabilidad fisiológica y genética. El género está ampliamente distribuido en la naturaleza y abarca muchos hábitats diferentes, colonizando suelos, aguas, plantas y animales. Se debe esperar un notable grado de adaptabilidad fisiológica y genética debido a dicha distribución universal (Sánchez, 2013).

2.2.8.1. Interacciones saludables con plantas.

Muchas *Pseudomonas* interactúan con las plantas; varias especies contribuyen a la salud de las plantas antagonizando con microorganismos patógenos de plantas (control biológico) e influyendo directamente en la resistencia y crecimiento de las plantas (promoción del crecimiento de plantas) tanto como endófitos de plantas y como colonizadores de rizosfera. Los principales metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Pseudomonas* han sido detectados e investigados debido a su actividad antimicrobiana (Sánchez, 2013).

Pseudomonas también pueden producir sustancias con acción insecticida, incluido *P. fluorescens* Pf-5, produce toxina insecticida contra el gusano cachón (*Manduca sexta*) del tabaco; *P. entomophila* con toxinas actualmente desconocidas contra *Drosophila* y *P. syringae* con una acción desconocida contra los áfidos (Sánchez, 2013).

2.2.8.2. Biorremediación.

La biorremediación utiliza microorganismos para degradar o desintoxicar contaminantes ambientales peligrosos. La versatilidad nutricional excepcional de *Pseudomonas*, junto con la producción de biosurfactantes que pueden movilizar hidrocarburos y líquidos de fase no acuosa en fase acuosa, los convierte en excelentes candidatos para la biorremediación. *P. aeruginosa* se aísla con frecuencia en suelos contaminados con petróleo y agua subterránea. *P. putida* es una importante especie biodegradadora, que es capaz de metabolizar algunas de las toxinas ambientales. Se han aislado más cepas de *P. putida* con capacidades degradativas significativas del ambiente que cualquier otra especie bacteriana. Otras especies de *Pseudomonas* identificadas con propiedades de biorremediación incluyen *P. mendocina* y *P. stutzeri* (Sánchez, 2013).

2.2.8.3. Patógenos.

En el género *Pseudomonas*, las especies patógenas relevantes son: *P. aeruginosa*, un patógeno humano oportunista que fue identificado por la Fuerza de Tarea Antimicrobiana de la

Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América como una de las seis principales amenazas de enfermedades infecciosas. Es la principal causa de mortalidad entre los pacientes con fibrosis quística y una de las causas más comunes de neumonía asociada a un hospital. Este patógeno persistente ataca las heridas, las quemaduras, los ojos y el tracto urinario, además de causar infecciones generales sistémicas (Sánchez, 2013).

P. syringae es un patógeno de plantas foliares que causa una variedad de plagas, manchas y enfermedades puntuales en muchos cultivos agrícolas importantes, como el tomate, soya, arroz y tabaco, para nombrar solo algunos. Mas de 50 diferentes variedades patogénicas (patovares) han sido nombrados dentro de este complejo. Además de ser un importante patógeno agrícola, esta especie, junto con *P. viridiflava*, es también uno de los sistemas modelos más importantes para el estudio de las proteínas de virulencia secretadas y su papel en las interacciones patógeno- huésped. Por otro lado, *P. entomophila* se aisló de moscas de la fruta y posteriormente se descubrió que era un patógeno de *Drosophila* (Sánchez, 2013).

2.2.8. *Pseudomona aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria móvil con forma de bacilo, Gram negativa. Difiere de otros miembros del género *Pseudomonas* debido a su potencial patogenicidad para los seres humanos y otros mamíferos. Participa en infecciones en individuos inmunocomprometidos, así como de pacientes que padecen sida, cáncer, quemaduras y fibrosis quística. Las infecciones por *P. aeruginosa* son normalmente difíciles de erradicar (Sánchez, 2013).

P. aeruginosa es un generalista con una competencia metabólica diversa. Puede utilizar moléculas pequeñas simples, así como compuestos orgánicos complejos como fuentes de carbono y es capaz de crecer aeróbica y anaeróbicamente usando NO_3 o arginina como aceptores de electrones respiratorios. Crece en un amplio rango de temperaturas, desde temperaturas ambientales comunes hasta 42 °C, con una temperatura óptica de 37 °C (Sánchez, 2013).

Es un patógeno oportunista capaz de producir una amplia variedad de factores de virulencia, incluidos lipopolisacáridos, flagelo, pili tipo IV, proteasas, exotoxinas, piocianinas, exopolisacáridos, secreción tipo III, etc. Se ha demostrado que muchos de los factores de virulencia extracelular están regulados por señales de detección de quórum. La formación de biopelículas también se puede considerar como un factor de virulencia. Las infecciones agudas con *P. aeruginosa* pueden ser potencialmente mortales, porque da como resultado un daño tisular grave y septicemia (es decir, invasión de la corriente sanguínea). Aunque la patogenicidad de *P. aeruginosa* se caracteriza típicamente por un alto nivel de producción de toxinas; se conocen varias excepciones importantes a esto, particularmente en los casos de ciertas infecciones crónicas de *P. aeruginosa*, desarrolla adaptaciones genéticas durante la persistencia a largo plazo, en las cuales normalmente se eligen factores de virulencia. Esto muestra que *P. aeruginosa* es capaz de preferir distintas estrategias para diferentes tipos de infecciones (Sánchez, 2013).

Otra característica notable de *P. aeruginosa* es su tolerancia a muchas drogas antimicrobianas. Tiene varios mecanismos inherentes de resistencia a los antibióticos que incluyen una AmpC β – lactamasa, lo que lo hace inherentemente resistente a la cefalotina y a la ampicilina. *P. aeruginosa* también tiene bombas de eflujo como MexAB-OprM, por lo que es impermeable a muchos antibióticos. MexAB-OprM elimina β -lactámicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, novobiocina, así como varios tintes y detergentes. Finalmente, se ha demostrado que a través de la mutación *P. aeruginosa* es capaz de desarrollar resistencia a los antibióticos a los que la cepa no es inherentemente resistente, como los aminoglucósidos y la colistina (Sánchez, 2013).

2.2.9. Taxonomía del género *Pseudomonas*.

Pseudomonas ha llegado a ser objeto de estudios profundos en todo el mundo, que desencadenaron cambios en la nomenclatura del grupo. Por ejemplo, en sus comienzos el género fue establecido basándose en características morfológicas y metabólicas y, en la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, se listaron alrededor de 29 especies bien caracterizadas junto

con otras 235 especies menos estudiadas. Luego, este número fue reducido a sólo 112 especies formalmente reconocidas en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Muchos de los organismos originalmente descritos como especies del género *Pseudomonas* han sido reclasificados (Castro, 2012).

Los pioneros en la clasificación taxonómica del género *Pseudomonas* fueron Palleroni y colaboradores de la Universidad de California, Berkeley, USA, quien en 1963 describió cinco grupos de *Pseudomonas* basadas en la hibridación rRNA-DNA. Desde entonces la taxonomía del género *Pseudomonas* ha sufrido una serie de rearrreglos y hoy en día solamente el grupo I de rRNA corresponde al género *Pseudomonas* (Slabbinck, De Baets, Dawyndt, & De Vos, 2010).

En 2012 se realizó una actualización con 138 cepas de *Pseudomonas* (135 cepas de tipo *Pseudomonas*); de igual forma, se incluyeron las especies de *Pseudomonas* recientemente descritas (*P. alkylphenolia* y 2 subespecies de *P. chlororaphis*), con el fin de alcanzar una visión integral de las relaciones filogenéticas de la especie en el género *Pseudomonas* (Sánchez, 2013).

El primer linaje se dividió en seis grupos, cada uno representado por la especie *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* y *P. straminea*. El grupo de *P. fluorescens* fue el más complejo e incluyó 9 subgrupos, representados por las especies *P. fluorescens*, *P. gessardi*, *P. fragi*, *P. mandelii*, *P. jesseni*, *P. koreensis*, *P. corrugata*, *P. chlororaphis* y *P. asplenii* (Sánchez, 2013).

El segundo linaje, de *P. aeruginosa*, se dividió en cuatro grupos principales representados por las especies *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. stutzeri* y *P. oryzae*. El grupo *P. pertucinogena* fue independiente de cualquier linaje. *P. luteola*, *P. caeni* y *P. duriflava* se consideraron como valores atípicos del género (Sánchez, 2013).

2.3. GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSICOS.

- **Aerobacterias:** Bacterias que son transportadas por las corrientes de aire.
- **Aire:** Mezcla gaseosa que constituye la atmosfera terrestre, el aire es una mezcla de varios gases. La composición del aire puro es: nitrógeno, 78,08%; oxígeno, 20,94%; argón, 0,93%; neón, 0,0018%; helio, 0,0005%; hidrógeno, 0,00005%; indicios de kriptón, xenón y metano. Otros gases, especialmente vapor de agua y dióxido de carbono, se encuentra en proporciones variables.
- **Aerosol:** Es la mezcla heterogénea de partículas sólidas o líquidas en un medio gaseoso, cuyo tamaño va desde 0,002 μm (algunas moléculas) hasta 100 μm , esto significa que pueden permanecer en suspensión por un tiempo de al menos 1 hora.
- **Atmósfera:** Capa gaseosa que envuelve la tierra, y en sentido más general, la que envuelve cualquier cuerpo celeste. Los gases resultan atraídos por la gravedad del cuerpo, y se mantienen en ella si la gravedad es suficiente y la temperatura de la atmosfera es baja.
- **Bioquímica:** Es una ciencia que estudia la composición química de los seres vivos, especialmente las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, además de otras pequeñas moléculas presentes en las células y las reacciones químicas que sufren estos compuestos (metabolismo) que les permiten obtener energía (catabolismo) y generar biomoléculas propias (anabolismo).
- **Pruebas bioquímicas:** Son una serie de análisis que sirven para determinar la actividad metabólica de una cepa pura de microorganismos. Son empleadas principalmente para la identificación y clasificación de bacterias y hongos.
- **Liberación:** Proceso por el cual las partículas son liberadas a la atmósfera de forma pasiva o activa.

- **Dispersión:** Proceso por el cual las partículas biológicas son transportadas por las corrientes de aire, las turbulencias y la lluvia. La concentración de las mismas en la atmósfera irá disminuyendo cuanto mayor sea la distancia a la fuente de origen.
- **Deposición:** Proceso por el cual las partículas biológicas son transportadas por el aire y pueden depositarse en la superficie del agua, en el suelo, en la vegetación, etc, bien sea mediante sedimentación debida al efecto de la gravedad, por lavado como consecuencia de la lluvia o por impacto con una superficie que se encuentre en la trayectoria de la corriente de aire.
- **Impacto:** Proceso por el cual las partículas aerobiológicas provocan un impacto en el lugar en el que se depositan, estando implicadas en la polinización, la contaminación ambiental y el biodeterioro, y causando efectos negativos sobre la salud humana, animal y vegetal.
- **Infección nosocomial:** Es una infección contraída durante una estancia en un centro de salud. Una infección se considera nosocomial si aparece al menos 48 horas después de entrar en las instalaciones de un centro de salud.
- **Biosurfactantes:** Son un grupo de moléculas de origen microbiano que se caracterizan por ser anfipáticas, es decir que sus moléculas presentan dos partes diferentes, una hidrofóbica y otra hidrofílica.
- **Quorum sensing (SQ):** Consiste en un proceso de comunicación intercelular que se produce cuando alcanzan elevadas concentraciones en la población, con el objetivo de iniciar acciones cooperativas. Ello implica la producción y liberación al medio de pequeñas moléculas señalizadoras, también denominadas autoinductores, por parte de las células bacterianas.
- **Biovar:** Es una variante procariota cepa que difiere fisiológicamente o bioquímicamente de otras cepas de una especie particular.
- **Lux:** (Símbolo: lx) es la unidad para iluminancia o nivel de iluminación; equivale a un lumen/m². Se usa en fotometría como medida de la intensidad luminosa.

- **Fibrosis quística:** Es una enfermedad genética autosómica recesiva que se produce como consecuencia de una alteración del gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) situado en brazo largo del cromosoma 7.
- **Metabolismo:** Todas las reacciones bioquímicas que ocurren en una célula para poder producir energía.
- **Quimiorganotrofo:** Un organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.
- **Quimiolitotrofo:** Organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos.
- **Psicrófilo:** Organismos con una temperatura óptica de crecimiento de 15 °C o menor y una temperatura máxima de crecimiento inferior a 20 °C.
- **Sideróforos:** Agentes quelantes de hierro que pueden unir hierro presente en muy bajas concentraciones.

2.4. HIPÓTESIS.

En el aire exterior de la ciudad de Piura, Perú, existen *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. stutzeri*.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.

3.1. ENFOQUE Y DISEÑO.

Enfoque: Cualitativo.

Diseño: No experimental.

Nivel: Descriptivo.

Tipo: Básico.

3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN.

3.2.1. Población.

Bacterias en el aire exterior de la ciudad de Piura, Perú, entre marzo y septiembre del 2017.

3.2.2. Muestra.

Bacterias del aire de la ciudad de Piura, Perú, en los exteriores del Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) y de la Municipalidad Provincial de Piura, entre marzo y septiembre del 2017.

3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.

3.3.1. Ubicación y Colecta de muestras.

Las muestras procesadas fueron cultivos puros bacterianos de morfología bacilar conservados en el laboratorio de bioquímica y biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura; provinieron de muestras de aire tomadas en tres puntos exteriores al Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) y Municipalidad Provincial de Piura, lugares que están comprendidos en el plan

de acción del aire de la ciudad de Piura (GESTA PIURA) propuesto por el Ministerio del Ambiente (MINAM, 2010).



Figura 3.1. Ubicación de los tres puntos (Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional CONAFOVICER y Municipalidad Provincial de Piura) de donde procedieron las muestras de aire. Fuente: Google Maps.

En cada zona y en tres turnos diarios se eligió un día aleatorio en cada semana durante los meses de marzo a septiembre del 2017. Los turnos fueron 7:00 am - 8:00am (turno mañana), 2:00 pm-3:00 pm. (turno tarde) y 6:00 - 7:00 pm (turno noche). Con un anemómetro se tomaron algunos parámetros ambientales (temperatura, humedad relativa , velocidad de viento y nivel de iluminación); usando un muestreador de aire microbiológico (método de filtración e impactación) programado para aspirar 20 litros de aire por 15 segundos se impactaron placas de 90 mm con el medio agar tripticasa soya (TSA) y agar sangre (Domínguez, 2014). Las placas se incubaron a 35°C por 24 a 48 horas y se aislaron las colonias en tubos con agar tripticasa soya (TSA) inclinado.

3.3.2. Confirmación de bacilos Gram negativos y conservación de cepas bacterianas:

Se procesaron con la coloración de Gram para verificar los cultivos puros bacterianos (muestras) de morfología bacilar. Las preparaciones se observaron en el microscopio con el objetivo de 100x y con una gota de aceite de inmersión (Domínguez, 2014). Estos cultivos puros de bacilos Gram negativos confirmados fueron los que se procesaron para determinar las especies de *Pseudomonas*

Los cultivos determinados como bacilos Gram negativos, fueron conservados en agente crioprotector, glicerol con BHI al 15% (García & Uruburu, 2008).

3.3.3. Determinación de especies de *Pseudomonas*.

3.3.3.1. Catalasa en portaobjeto.

Con un asa de inoculación se recogió el centro de una colonia pura de un cultivo de 18 a 24 horas y se colocó sobre un portaobjeto limpio; luego, con un gotero se agregó una gota de H_2O_2 en los microorganismos ubicados en el portaobjeto; se observó la producción inmediata de burbujeo (liberación de gas) que indica a un resultado positivo; si no hay presencia de ninguna burbuja el resultado fue negativo (MacFaddin, 2003).

3.3.3.2. Prueba de oxidasa.

Para esta prueba se utilizó tiras reactivas con el reactivo dicloruro de N,N- dimetil-1.4- fenilendiamonio 0.1umol; 1- naftol 1,0 umol; se tomó del medio de cultivo con un hisopo estéril una parte de la colonia investigada y se aplicó sobre la zona reactiva frotando suave con el hisopo; al cabo de 20 a 60 segundos se comparó con la escala colorimétrica del envase (MacFaddin, 2003). Un resultado positivo origina un color azul a violeta azulado. Un resultado negativo origina un color crema pálido a amarillo (Merck, 2014).

3.3.3.3. Agar Mac Conkey (MAC).

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos. Se preparó el medio en placas Petri descartables, con un asa se sembró por estrías y luego se incubaron invertidas a 35 °C por 18 a 24 horas. En la interpretación los microorganismos fermentadores de lactosa presentan colonias rosadas-rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar, mientras, los microorganismos no fermentadores de lactosa presentan colonias incoloras (Britania, 2015).

3.3.3.4. Fermentación de hidratos de carbono (glucosa, inositol, maltosa).

Determina la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible. Para obtener el caldo básico de fermentación con rojo de fenol se preparó el caldo nutritivo como indicaba el rótulo del medio; se agregó 0,018 g de rojo de fenol por litro de medio; luego, se homogenizó y se añadió el azúcar a la base en la concentración deseada, se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 min y se dejó enfriar. De un cultivo puro menor a 24 horas se inoculó a la batería de hidratos de carbono, se incubó a 37° C, de 24 a 48 hrs. La batería de azúcares probados fueron glucosa, inositol y maltosa. El resultado positivo para la fermentación, fue la observación de un color amarillo (ácido); un resultado tardío mostraba un color anaranjado (se comparó con un tubo no inoculado y se reincubó); y, un resultado negativo presentaba un color rosa rojizo (alcalino) (MacFaddin, 2003).

3.3.3.5. Prueba en agar hierro - triple azúcar (TSI).

Se emplea para detectar la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa con formación de ácido y gas, también para detectar producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

Con un asa recta se tocó la parte superior de una colonia pura y se sembró en el tubo con agar TSI, primero por punción inocular el medio de cultivo, picando el fondo y después

extendiendo por estrías en la superficie del agar inclinado; se incubó el tubo a 35° C durante 18 a 24 horas. Los resultados se leen según los siguientes criterios:

- Superficie alcalina/ profundidad ácida (pico rojo/ fondo amarillo): el microorganismo solo fermenta la glucosa.
- Superficie ácida / profundidad ácida (pico amarillo/ fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y sacarosa.
- Superficie alcalina / profundidad alcalina (pico rojo/ fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
- Taco alcalino (rojo) y bisel alcalino (rojo): Ninguno de los tres glúcidos es fermentado La aparición de burbujas en el taco indica que la fermentación se ha efectuado con producción de gas.
- Un ennegrecimiento en el medio indica la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (Britania, 2015)

3.3.3.6. Prueba de movilidad e indol en medio SIM y Edwards- Ewing (solo movilidad).

Se utiliza para determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil; asimismo, para determinar la producción de indol y ácido sulfúrico.

En SIM y Edwards- Ewing, medios semisólidos, se inoculó con aguja bacteriológica, en profundidad y en el centro del tubo; luego, se incubó a 35 °C por 24 – 48 horas. La movilidad se manifiesta mediante una turbidez que se forma alrededor de la línea de siembra, mientras, sin movilidad se observa un crecimiento sólo en la línea de siembra y el resto de la superficie se observa limpia.

En el SIM el sodio tiosulfato y el amonio hierro(III) sulfato permiten poner de manifiesto la formación de sulfuro de hierro (H₂S) por el precipitado negro que se forma.

Para demostrar la producción de indol se agregaron tres a cinco gotas del reactivo de Kovacs. La prueba es positiva cuando la parte superior del medio cambia a rojo; es negativa si no se observa color rojo (MacFaddin, 2003).

3.3.3.7. Agar Lisina Hierro (LIA).

El agar lisina hierro se utiliza para la diferenciación de bacilos Gram negativos basada en su capacidad de descarboxilación o desaminación de lisina y la formación de ácido sulfhídrico. La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y desaminasa. El citrato de hierro y amonio y el tiosulfato de sodio son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico y el purpura de bromocresol, es el indicador de pH. Las muestras se sembraron mediante el uso de aguja de inoculación, se inocularon el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo en estría sobre la superficie inclinada; luego, se incubaron por 18 a 24 horas a 35°C. Los resultados se leen según los siguientes criterios:

- Descarboxilación de la lisina: Resultado positivo: superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta).
- Resultado negativo: superficie alcalina / profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).
- Desaminación de la lisina: Resultado positivo: superficie rojiza / profundidad ácida.
- Producción de SH_2 : Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente entre el límite entre la superficie y profundidad). Resultado negativo: el medio de cultivo permanece sin cambio de color (Britania, 2015).

3.3.3.8. Agar citrato de Simmons.

Es un medio de cultivo utilizado para diferenciar las bacterias Gram negativas en función de su capacidad de utilizar el citrato como única fuente de Carbono.

Los tubos con el medio inclinado (pico de flauta) se inocularon mediante estrías con un asa bacteriológica de un cultivo puro de 18 a 24 horas, en la superficie del medio de cultivo; luego, se incubaron a 35 °C por 18 a 24 horas. Una reacción positiva (utilización de citrato) cambia el color del medio de verde a azul brillante (reacción alcalina) y es negativa cuando el color permanece verde sin cambios (no utilización de citrato) (MacFaddin, 2003).

3.3.3.9. Hidrolisis de esculina.

Se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido y la esculina para producir esculetina y dextrosa. La esculetina reacciona con la sal férrica para formar un complejo entre marrón oscuro y negro. El citrato férrico se incorpora en el medio como indicador de hidrólisis de la esculina y la formación resultante de esculetina. La inoculación se realizó de un cultivo puro de 18 a 24 horas, en estrías con un asa de inoculación; luego, se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C. Es un resultado positivo cuando el medio se torna de color castaño oscuro a negro, también es positivo cuando la mitad o más del medio se tiñe de negro, mientras en un resultado negativo no existe ennegrecimiento del medio o ennegrecimiento de menos de la mitad, después de una incubación de 48 horas. (MacFaddin, 2003).

3.3.3.10. Prueba de dihidrolasa (arginina) y descarboxilasa (ornitina).

Se emplea para determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad.

En el medio base de Moeller el piridoxal actúa como coenzima en la descarboxilación de los aminoácidos. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable mientras que el purpura de bromocresol y el rojo de cresol son los indicadores de pH. Los aminoácidos arginina y ornitina se agregaron, la concentración de aminoácidos debe ser al 1% (10g) por litro. La descarboxilación de ornitina genera putrescina. La arginina es hidrolizada a ornitina y luego es descarboxilada a putrescina. La inoculación se dio a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas, luego se recubrieron los tubos con 1 ml de vaselina estéril y se incubaron a 35 °C por 24 a 96 horas; si es necesario, se examinaron diariamente. Cualquier aminoácido da los mismos resultados de color, positivo: color purpura turbio a amarillo- purpura apagado (el microorganismo produjo cadaverina) mientras un negativo es de color amarillo brillante, claro (el microorganismo sólo fermentó la glucosa) (MacFaddin, 2003).

3.3.3.11. Agar cetrimida.

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies del género. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor. La inoculación se realizó en estrías con un asa bacteriológica en placas Petri descartables con agar cetrimida, de un cultivo puro de 18 a 24 horas, luego se incubaron a 35 °C por 24 a 48 horas. La presencia de un color verde- azulado correspondió a la producción de piocianina, mientras que un color verde corresponde a la producción de pioverdina y un color rosa claro, rojizo o marrón oscuro corresponde a la producción de piorrubina. Luego se observaron las placas bajo luz ultra violeta, para notar producción de fluoresceína de color amarillo verdoso brillante que se difunde en el agar a partir del crecimiento microbiano (Britania, 2015).

3.3.3.12. Agar *Pseudomonas* P.

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* en base a la producción de piocianina. Conocido también como medio King A. La glicerina favorece la producción de pigmentos, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de piocianina y piorrubina e inhiben la producción de fluoresceína. Se preparó el medio agregándole 10 ml de glicerina por litro. La inoculación se realizó en estrías con un asa bacteriológica en placas Petri descartables, de un cultivo puro de 18 a 24 horas, luego se incubaron a 35 °C por 24 a 48 horas. El resultado positivo es por observación de los pigmentos piocianina y/o piorrubina. La producción piocianina se observó color azul, azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento; mientras, la piorrubina se observa de color rojo (Britania, 2015).

3.3.3.13. Agar *Pseudomonas* F.

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* en base a la producción de fluoresceína. Conocido también como medio King B. La glicerina favorece la producción de pigmentos, la concentración de fosfato dipotásico estimula la producción de fluoresceína e inhibe la producción de piocianina y piorrubina. Se preparó el medio agregándole 10 ml de glicerina por litro. La inoculación se realizó en estrías con un asa bacteriológica en placas Petri descartables, de un cultivo puro de 18 a 24 horas, luego se incubaron a 35 °C por 24 a 48 horas. Se examinaron las colonias bajo luz ultravioleta. Un resultado positivo es la observación de fluoresceína, que es un pigmento de color amarillo-verdoso fluorescente que rodea la colonia o que se extiende por todo el medio de cultivo debido a fenómenos de difusión (Britania, 2015).

3.3.3.14. Prueba de reducción de nitratos/nitritos ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$).

Se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos o gas nitrógeno libre. En esta prueba se detecta una respiración anaerobia: la que utiliza nitrato como aceptor final de electrones. Los nitratos se reducen a nitritos y algunas bacterias reducen los nitritos a productos gaseosos (N_2 y N_2O). La inoculación se realizó con un asa bacteriológica, de un cultivo puro de 18 a 24 horas; inóculo denso; luego se incubó a 35°C por 24 a 48 horas. Primero se controló la formación de gas en el tubo de Durham; después se agregó 5 gotas de reactivo de Griess A y 5 gotas de reactivo de Griess B y se agitó el tubo con suavidad; un resultado positivo es cuando dentro de 1 a 2 minutos se pone de color rojo; el nitrato (NO_3^-) es reducido a nitrito (NO_2^-) por el microorganismo. Un resultado negativo no desarrolló color; a este tubo se le agregó directamente aproximadamente 20mg de polvo de zinc (Zn); un resultado es positivo cuando hay ausencia de color y un resultado es negativo si se pone de color rosa a rojo oscuro entre cinco a diez minutos (MacFaddin, 2003).

3.3.3.15. Licuefacción de la gelatina.

Se emplea para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan o hidrolizan la gelatina.

En caldo nutritivo se agregó 12 g de gelatina para 100 ml, se homogenizó y se esterilizó. La inoculación se realizó con un asa bacteriológica y se incubaron a 35°C por 24 a 48 horas. Primero se observó el crecimiento (turbidez) en el caldo, luego, se puso en refrigeración por 15 minutos; para interpretarlos, se sacó las muestras a temperatura ambiente: si se encuentran líquidos, hay licuefacción de gelatina (positiva), si está solidifica no hay licuefacción de gelatina (negativa) (MacFaddin, 2003).

3.3.3.16. Lecitinasa:

Se realiza para determinar la capacidad de los microorganismos para producir la enzima lecitinasa, evidenciada por la opacidad en la yema de huevo o turbidez en el suero.

Se realiza en agar yema de huevo; para su preparación se usó de base agar tripticasa soya (TSA); ya estéril, de manera aséptica se separó la yema de un huevo de gallina libres de antibióticos y con una jeringa de 20ml se aspiró y se agregó a 500ml del medio, se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea. Se dispensó en placas Petri divididas descartables y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La inoculación se dio de un cultivo puro de 18 a 24 horas, con un asa bacteriológica, luego, se incubó durante 24 a 72 horas a una temperatura de 35 °C. Cuando hubo actividad de lecitinasa positiva se observó un halo opaco, opalescente (blanco lechoso) que rodea las colonias; el precipitado insoluble se ve mejor al trasluz. La prueba de la lecitinasa es negativa cuando no se observó ningún halo opaco en el medio de cultivo (MacFaddin, 2003).

3.3.3.17. Lipasa:

Se utiliza para determinar la capacidad de microorganismos para producir la enzima lipasa, que cataliza la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol, evidenciada por un brillo aceitoso, iridiscente, sobre las colonias y alrededor de ellas en el medio en placa.

Se usó agar tripticasa soja (TSA) como medio de cultivo basal, para la preparación de agar yema de huevo, de manera aséptica se separó la yema de un huevo de gallina libres de antibióticos y con una jeringa de 20ml se aspiró y se agregó 500ml al medio, se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea. Se dispersó en placas Petri divididas descartables y se dejó solidificar a temperatura ambiente. La inoculación se dio de un cultivo puro de 18 a 24 horas, con un asa bacteriológica, luego, se incubó durante 24 a 72 horas a una temperatura de 35 °C. En la lectura se obtuvo lipasa positiva cuando se observó un brillo aceitoso, iridiscente,

sobre las colonias y alrededor de ellas, para ver mejor se observó la placa en ángulo con la luz y lipasa negativa ningún cambio en el aspecto de las colonias o del medio de cultivo (MacFaddin, 2003).

3.3.3.18. Hidrólisis de almidón:

Se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos. Se empleo agar Mueller Hinton como medio basal. Se disolvió 20g de almidón (0,2%) en 1 l de agua destilada; autoclavado el medio, se sirvió en placas Petri divididas descartables. La inoculación se realizó con un asa bacteriológica de un cultivo puro de 18 a 24 horas y se incubó a 35°C por 18-24 horas, para la lectura se observó que tenga un regular crecimiento, luego, se agregó unas gotas de lugol directamente sobre la colonia bacteriana y se registró los resultados de inmediato. La interpretación es positiva cuando se observa el medio de color purpura- azul con un área incolora (zona de hidrólisis) alrededor del crecimiento y es negativa cuando no hay presencia del halo incoloro alrededor de la colonia bacteriana (MacFaddin, 2003).

3.3.3.19. Extracción de pigmento con cloroformo:

Esta prueba bioquímica permitió investigar los pigmentos producido por cepas de *Pseudomonas*. De cultivos puros de bacterias crecidos por 18-24 horas, se sembró el microorganismo en estudio en caldo nutritivo y se incubó a 35 °C por 24 a 48 horas; luego, se agregó 1 ml de cloroformo al contenido del tubo y se agitó suavemente. Una prueba positiva es cuando la fase clorofórmica toma color azul verdoso por extracción de piocianina. Una prueba negativa es cuando la fase clorofórmica permanece amarilla (no se extrajo pigmento) (UCV, 2012).

3.3.3.20. Oxidación / Fermentación (OxFerm):

Es una prueba que indica del tipo de metabolismo energético: respiratorio o fermentador. Se usó glucosa como sustrato. Se detecta la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base (azul de bromotimol). La bacteria se inoculó con aguja bacteriológica y se incubó a 35 °C por 24 horas en condiciones de aerobiosis (sin vaselina) y de anaerobiosis (con 2 ml de vaselina estéril), simultáneamente.

Las bacterias que respiran aerobiamente crecen en la superficie del medio del tubo abierto; transforman la glucosa en CO₂; la superficie del medio se verá ligeramente amarilla (por la formación de ácido carbónico originado al reaccionar el CO₂ con el agua del medio). En el tubo cerrado el cultivo se mantiene azul-verdoso. Las bacterias fermentadoras producen ácidos a partir de la glucosa. Viran el cultivo del tubo cerrado a amarillo; en el tubo abierto también producen ácidos virándolo amarillo al medio (MacFaddin, 2003)(Anexo 3).

3.3.3.21. Medio de cultivo caldo Rojo de Metilo/ Voges- Proskauer (MR/VP).

Prueba de rojo de metilo:

Es para conocer si el microorganismo tiene la capacidad de producir y mantener estables los productos ácidos de la fermentación ácido mixta de la glucosa (ácido acético, fórmico, láctico y succínico), y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. El rojo metilo es el indicador de pH utilizado para determinar la concentración de iones hidrógeno después de la fermentación de la glucosa. Los tubos con medio MR-VP fueron inoculados e incubados a 35 °C durante 48 a 72 horas, luego de ese período se les agregó dos gotas del indicador rojo de metilo y de forma inmediata se interpretó el color del resultado. La lectura se dice positiva cuando el microorganismo ha producido ácidos a partir de la glucosa, por lo que se mantendrá de color rojo; la lectura se afirma como negativa cuando se obtuvo un color amarillo.

Prueba de Voges-Proskauer:

La reacción de V.P. se basa en la detección de acetoína a partir de la fermentación butanodiolica de la glucosa. La acetoína que se produce en la fermentación; cuando reacciona con el hidróxido de potasio (KOH al 40% p/v) es oxidada a diacetilo, el que a su vez reacciona con los grupos guanidínicos de la arginina, que está presente en las peptonas que constituyen el medio, dando una coloración rojiza. Los tubos con medio MR-VP fueron inoculados e incubados a 35 °C durante 48 a 72 horas, luego de ese período se les agregó seis gotas del reactivo A (alfa naftol al 5% en alcohol etílico) y dos gotas del reactivo B (hidróxido de potasio (KOH) al 40%); los tubos se agitaron y dejaron reposar entre 10 a 15 minutos. Para la lectura de las pruebas V.P. se observó el color de la superficie del medio; el desarrollo de un color rojo indica que la prueba es V.P. positiva y negativa, ausencia de color rojo (MacFaddin, 2003).

3.3.3.22. Crecimiento bacteriano a 42 °C y a 4°C.

Esta prueba fue usada para diferenciar especies de *Pseudomonas*. En tubos inclinados de agar tripticasa soja (TSA) y en placas Petri descartables de agar cetrimida, *Pseudomonas* F y *Pseudomonas* P, se inocularon con un asa de bacteriología mediante estrías de un cultivo puro de 18 a 24 horas, se incubaron a 42 °C por 24 a 48 horas y a 4 °C hasta por 10 días, se revisó diariamente para observar el crecimiento bacteriano (MacFaddin, 2003).

3.3.3.23. Agar sangre.

El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se uso para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos. El medio fue suplementado con el 8% de sangre de caballo. Para su interpretación se observó los halos hemolíticos alrededor de las colonias según el siguiente criterio.

Hemolisis alfa: lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

Hemolisis beta. Lisis total de los glóbulos rojos, se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia.

Hemolisis gamma: ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia (Britania, 2015).

Asimismo, se usó para verificar el color y la forma de las colonias de *Pseudomonas oryzae* (Gutiérrez, Hernández, & Corrales, 2009).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS.

Se obtuvieron 1586 cepas bacterianas de muestras de aire exterior del Centro de Salud Micaela Bastidas, Centro Recreacional CONAFOVICER y Municipalidad Provincial de la ciudad de Piura. Se identificaron cinco especies de *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cichorii*, *P. oryzihabitans*, *P. stutzeri* y *P. putida biovar A*. El Centro recreativo CONAFOVICER fue donde se obtuvo mayor número de cepas positivas para *Pseudomonas spp* y *P. aeruginosa* la que apareció con mayor frecuencia.

Tabla 4. 1. Especies del género *Pseudomonas* aisladas e identificadas en el aire exterior de la ciudad de Piura.

Especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Cepa	Mes	Turno	Lugar
1000-2	Marzo	Mañana	Centro de Salud Micaela Bastidas
1050-2	Abril	Tarde	Centro recreativo CONAFOVICER
1078-2	Abril	Mañana	Municipalidad de Piura
Especie <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>			
Cepa	Mes	Turno	Lugar
1529-5	Julio	Noche	Centro recreativo CONAFOVICER
1665-5	Septiembre	Noche	Centro de Salud Micaela Bastidas
Especie <i>Pseudomonas cichorii</i>			
Cepa	Mes	Turno	Lugar
1017-2	Marzo	Tarde	Centro recreativo CONAFOVICER
1029-7	Marzo	Noche	Centro recreativo CONAFOVICER

Especie <i>Pseudomonas putida biovar A</i>			
Cepa	Mes	Turno	Lugar
1737-3	Septiembre	Noche	Centro de Salud Micaela Bastidas

Especie <i>Pseudomonas stutzeri</i>			
Cepa	Mes	Turno	Lugar
1521-4	Julio	Tarde	Municipalidad de Piura

De 1586 cepas aisladas, por su respuesta a la tinción de Gram se obtuvo 1473 cepas (92.88%) de bacterias Gram positivas, y de bacterias Gram negativas se obtuvieron 113 cepas (7.12%).

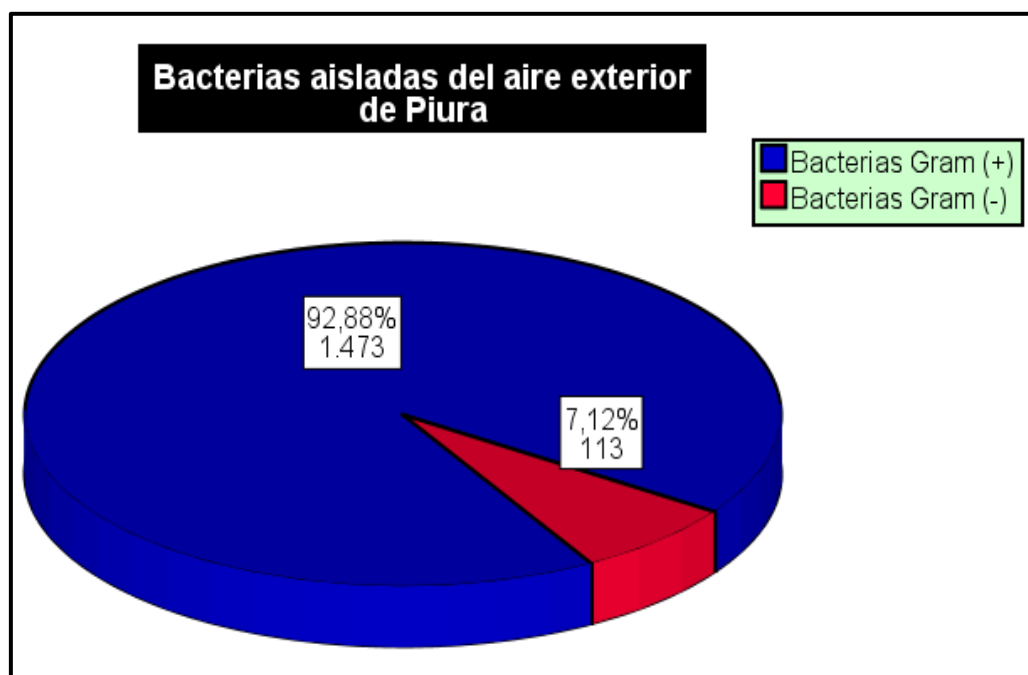


Grafico 4. 1. Porcentajes de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas aisladas del aire exterior de la ciudad de Piura.

Se aislaron nueve cepas de *Pseudomonas* que representan el 0.57% de 1586 aislamientos durante siete meses de muestreo (marzo - setiembre del 2017), en tres puntos de la ciudad de Piura, Perú (Gráfico 4.2).

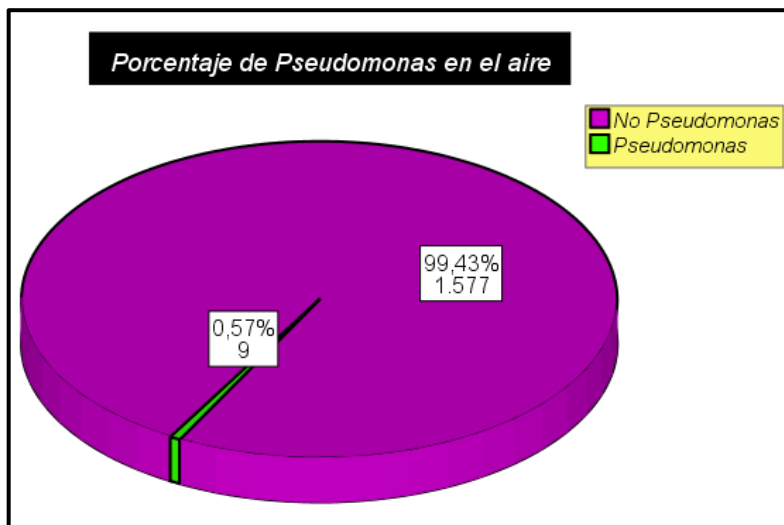


Gráfico 4. 2. Porcentaje de la frecuencia de cepas de *Pseudomonas* en el aire exterior de la ciudad de Piura.

Es decir, de las 88 cepas de bacilos Gram negativos, nueve cepas fueron positivas para *Pseudomonas*; que corresponde el 10,23% del total del grupo (Gráfico 4.3).

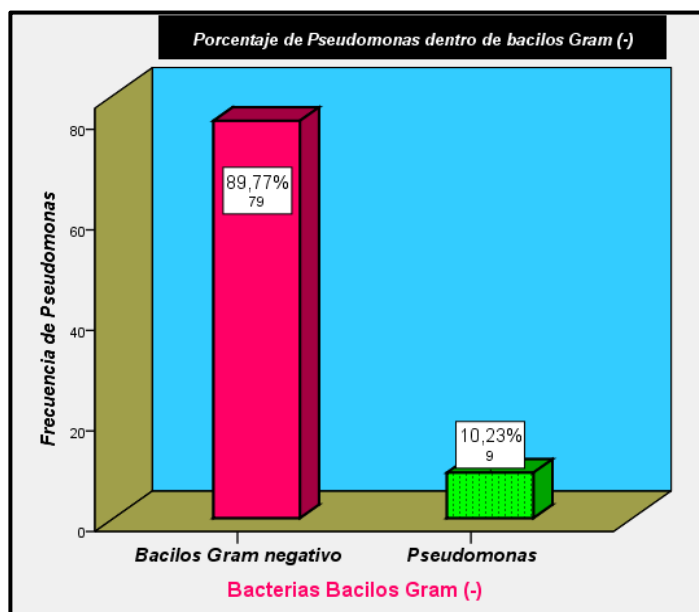


Gráfico 4.3. Frecuencia de *Pseudomonas* en el grupo de bacterias bacilos Gram negativos.

Durante los siete meses de muestreo entre marzo y septiembre del 2017, con un anemómetro se tomaron ciertos parámetros ambientales en los puntos exteriores (zonas) al Centro de Salud de Micaela Bastidas, Centro recreacional de Construcción Civil del Perú (CONAFOVICER) y Municipalidad Provincial de Piura. La temperatura promedio en la ciudad de Piura fue de 27 °C, con una máxima de 41.5°C en abril y una temperatura mínima de 19.6 °C en agosto. La humedad relativa promedio en los meses de muestreo fue de 61.4 %, con una máxima de 82.5 % en marzo y una humedad mínima de 40.5 % en septiembre. El nivel de iluminación promedio fue de 3266 lux, con una máxima de 19700 lux en marzo y un nivel de iluminación mínima de 3 lux en junio. La velocidad del viento promedio fue de 0.8 m/s, con una máxima de 7.8 m/s en abril y una velocidad de viento mínima de 0 m/s presente en todos los meses de muestreo. En la moda se obtuvo los valores más frecuentes, en temperatura fue 26.5 °C, humedad relativa 72.5%, nivel de iluminación 3200 lux y velocidad del viento 0 m/s. (Tabla 4.2).

Tabla 4. 2. Media, mediana y moda de la temperatura, humedad relativa, nivel de iluminación y velocidad del viento.

Estadísticos				
	Temperatura	Humedad	Nivel de iluminación	Velocidad del viento
Media aritmética	27°C	61,4%	3266 lux	0,8m/s
Moda	26,5°C	72,5%	3200 lux	0,0m/s

De los parámetros ambientales (temperatura, humedad, nivel de iluminación y velocidad del viento) los promedios que tuvieron relación con el número de cepas bacterianas aisladas en el aire exterior fue la iluminancia. Se observó que cuando aumentaba el nivel de iluminación el número de cepas bacterianas disminuía, así en los meses de marzo (115 cepas) y abril (161 cepas), meses donde

se obtuvo el menor número de cepas durante el muestreo, sin embargo, cuando la iluminancia disminuía el número de bacterias aumentaba (Grafica 4.8).

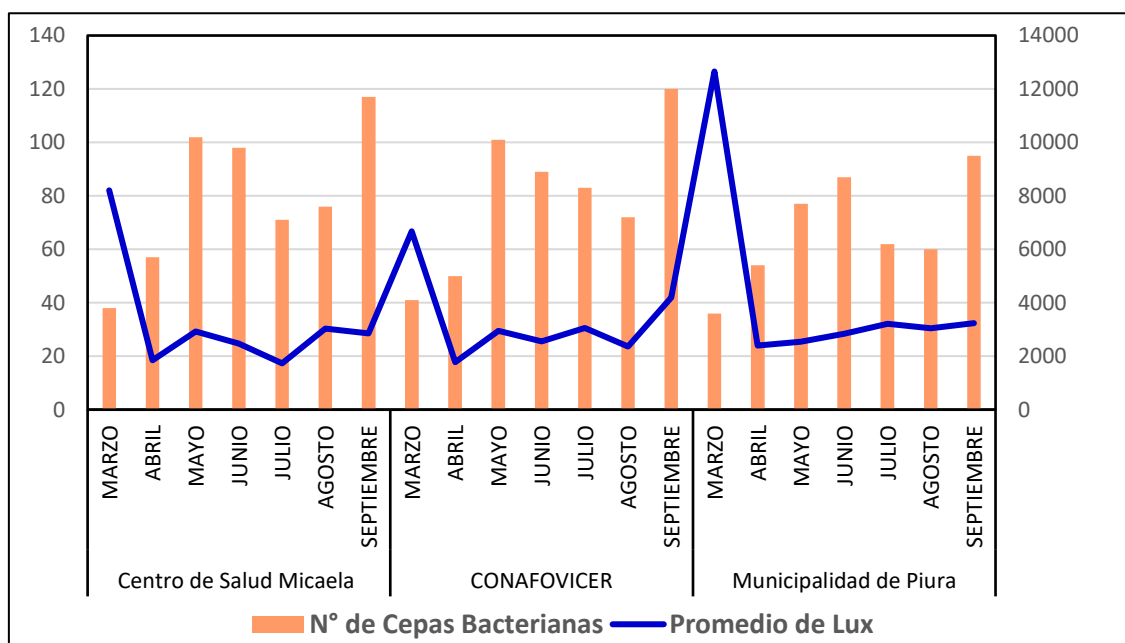


Grafico 4. 4. El número de cepas bacterianas del aire exterior en relación con el parámetro ambiental nivel de iluminación.

Las cepas determinadas como *Pseudomonas*, fueron conservados en agente crioprotector, BHI con glicerol al 15%, a una temperatura de -11°C , en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad Nacional de Piura (Anexo 9), Figura 14.

4.2. DISCUSIÓN.

La mayoría de reportes previos consultados sobre la identificación de *Pseudomonas* están relacionados con el aislamiento de muestras clínicas, fitopatógenos o en ambientes como suelos y agua; siendo, *Pseudomona aeruginosa* la más estudiada como un patógeno oportunista (MacFaddin, 2003).

Se afirma que la mayoría de bacterias presentes en el aire son del tipo saprofitas y proceden del suelo, siendo las más frecuentes las bacterias cromógenas, bacilos esporulados y los cocos (De la Rosa, Mosso, & Ullán, 2002). En Tubará, Colombia, las especies más representativas fueron las Gram positivas. La presencia de este tipo de aerobacterias superó por más del 60% a las Gram negativas (Carvajal, 2016). En este estudio, en la ciudad de Piura, se encontró en el aire exterior que la mayoría de bacterias aisladas fueron Gram positivas con 1473 cepas representando un 92,88% del total de los aislamientos.

La supervivencia de una bacteria al ser estresada dependerá de su capacidad de reparar las funciones biológicas afectadas (Carvajal, 2016) especialmente por las características del medio en el cual se desenvuelven; la atmósfera no es un hábitat en sí misma, sino simplemente un medio de transporte y la presencia de uno u otro tipo bacteriano depende de su resistencia y su origen (suelo, agua y seres vivos) (Jacinto, 2013).

La mayoría de las bacterias que entran a la atmósfera provienen de fuentes naturales como la vegetación, el suelo y los cuerpos de agua, y en menor proporción de las actividades antropogénicas; esto se fundamenta en el hecho de que los microorganismos constituyen uno de los grupos más abundantes en el ambiente (Jacinto, 2013). Por tanto, se puede asumir que los microorganismos presentes en el aire (atmósfera) provienen de fuentes naturales y artificiales.

En Tubará, Colombia, se reportaron las mayores concentraciones de aerobacterias debido a que la liberación de partículas aerotransportables se incrementaban en días secos, conforme aumenta la temperatura y la velocidad del viento y se reduce la humedad relativa (Carvajal, 2016). Además, en algunos lugares de Europa, Estados Unidos y Canadá se han encontrado altas concentraciones de aerobacterias en verano y bajas en invierno, asociadas con períodos polvosos de sequía durante la primera temporada, mientras que en primavera e invierno la lluvia y la nieve permiten la disminución de la concentración de aerobacterias (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). Durante los siete meses de muestreo de bacterias en el aire de la ciudad de Piura, en marzo y abril se tuvo el menor número de

aislamientos que se relacionaría con las lluvias durante el fenómeno del Niño. En cambio, parece que no hubo influencia de la temperatura y humedad sobre el número de bacterias encontradas; solo se observó cierta relación con la iluminancia.

Hay estudios que parecen indicar que el crecimiento bacteriano no sólo se ve influenciado por la humedad y velocidad del viento, sino que puede variar por otros factores climáticos (Carvajal, 2016).

La susceptibilidad de las bacterias Gram negativas se debe a los factores climáticos, puesto que la temperatura, la humedad relativa y radiación solar son factores limitantes; ya sea por exceso o por déficit inducen inactivación bacteriana; cuando esto sucede se ven afectados principalmente los fosfolípidos y proteínas celulares (Carvajal, 2016). Las Gram negativas representan una baja proporción de la población de las aerobacterias, donde los grupos representativos son las *Pseudomonas* (5.5- 10.7%), principalmente en zonas rurales, y las *Xanthomonas* (0-7.6%) en zonas costeras (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). En este trabajo *Pseudomonas* represento el 7.96 % de las bacterias Gram negativas en el aire de Piura, y el 10, 23% de los bacilos Gram negativos.

El aire en cualquier ambiente contiene una carga microbiana que es aportada en gran parte, por las personas que están presentes en estos sitios y el tipo de actividades que en ellas se realizan (Ruiz, y otros, 2017). La presencia de ciertas especies de *Pseudomonas*, estaría relacionado con algunas características que presenta la zona de estudio; *Pseudomonas oryzihabitans* es aislado típicamente en cultivos de arroz, suelos y aguas estancadas (Silva, 2015), aunque también este microorganismo se ha aislado de lugares donde se creería que no podría sobrevivir como en restos de petróleo, gasolina y formaldehidos, entre otros, lo cual demuestra una gran adaptación de la bacteria a ambientes hostiles (Gutiérrez, Hernández, & Corrales, 2009). En cambio, en el ambiente hospitalario se ha aislado de desagües y equipos de terapia respiratoria. Su aislamiento en muestras clínicas es poco frecuente y se ha descrito como agente de seudobrotes por contaminación durante la toma de muestra de hemocultivos (Silva, 2015).

En este trabajo *P. oryzihabitans* y *P. cichorii* se encontró en muestras de aire exterior del Centro Recreativo CONAFOVICER, donde funcionan piscinas y muy cerca hay madereras (la mayoría usan cascara de arroz para almacenar la madera) como también la presencia de polvo por la falta de asfalto completo de las calles; misma situación se puede ver en el Centro de Salud Micaela Bastidas; además, la situación del “Niño costero” produjo presencia de agua estancada en la vías sin asfalto; probablemente esto incrementa el número de bacterias en el aire de estas zonas.

Las plantas, al ser un hábitat natural de muchos microorganismos (saprobios o patógenos), entre los que se incluyen las bacterias, contribuyen de manera importante a incrementar el número de éstas suspendidas en el aire, por la acción del viento y de la lluvia, así como por el roce entre las mismas hojas. Durante la época húmeda del año la vegetación puede liberar una mayor carga bacteriana a la atmósfera que el suelo (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). Varias *Pseudomonas* son aisladas de plantas; Por ejemplo, *Pseudomona cichorii* es una bacteria patógena de muchas plantas herbáceas, causa lesiones necróticas de color pardo oscuro a negras en hojas y tallo, es capaz de sobrevivir en hojas secas de plantas enfermas o incluso, en tejido enfermo enterrado (Guzmán, 2007); también se ha encontrado en hojas y tallos de *Ocimum basilicum* (albahaca) (Soto, y otros, 2003), en *Cichorium* (achicoria o endivia) (Garrity, Brenner, Kreig, & Staley, 2005); en hojas de café (*Coffea arabica*) (Sánchez, Zapata, Rodríguez, & Beaver, 2003). Por otra parte, ciertas *Pseudomonas* se encuentran asociadas a las plantas; en Tumbes, Perú, se aislaron *P. stutzeri*, *P. putida* y *Pseudomonas spp.* de *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii* (guayacán) (García, Solís, & Llacsa, 2016); de igual manera, *P. aeruginosa* fue aislada en hojas y semillas de *Azadirachta indica* (neem) (Chamorro, D'Luis, & Pérez, 2017). En Piura, el aislamiento en muestras de aire de *P. cichorii*, *P. putida* biovar A, *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* puede que esté influenciado por la presencia de plantas de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Azadirachta indica* (neem), *Delonix regia* (ponciana), *Ficus indica* (ficus), *Bougainvillea spectabilis* (papelillo), que se encuentran en los puntos de muestreo. Así

mismo, varias especies de *Pseudomonas*, también han sido aisladas de muchos materiales naturales, especialmente el suelo y el agua (Garrity, Brenner, Kreig, & Staley, 2005).

El viento y las corrientes turbulentas de aire tienen enorme influencia sobre la distancia que recorren las partículas después de ser liberadas; así, el transporte de aerobacterias se puede presentar desde unos pocos metros hasta varios kilómetros (Carvajal, 2016). Tanto es así, que en la atmósfera de las Islas Vírgenes se ha aislado *Pseudomonas aeruginosa*, proveniente de polvo africano (Barriga & Mercado, 2007). Según estudios en la ciudad de Piura, el efecto de los vientos a nivel urbano con respecto a la dispersión de los contaminantes muestra poca variabilidad debido a la escasa rugosidad de la ciudad con construcciones poco elevadas (2 a 3 pisos en su mayoría) (Rivera, Sanchez, & Concepción, 2011). Asimismo, se observaron intensidades débiles de la velocidad del viento (< 3 m/s) y una dirección del viento predominante del sur que determina el transporte de los contaminantes hacia el norte y noreste de la ciudad (Rivera, Sanchez, & Concepción, 2011). En este trabajo, el promedio de velocidad de viento fue de 0,8 m/s y una máxima de 7.8 m/s.

De otro lado, en Marsella, Francia, se demostró que el número de bacterias se incrementaba con la temperatura y la velocidad del viento, en particular bacterias Gram negativas, sobre todo en el área urbana. Asimismo, en zonas urbanas se ha registrado la introducción de microorganismos a la atmósfera asociada a la turbulencia vehicular y a la gran densidad poblacional (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). Asimismo, se encontró que los sitios abiertos y con árboles tuvieron entre seis a siete veces menos microorganismos que las calles de París, Francia, así como hubo una variación diurna con dos máximos (6-8 de la mañana y 8-9 de la tarde) y dos mínimos (2 de la mañana y 2 de la tarde) (De la Rosa, Mosso, & Ullán, 2002). Resultado similar se ha obtenido en este estudio; es así que en las afueras de la Municipalidad Provincial de Piura se registró el menor número de cepas bacterianas en el aire durante los siete meses de muestreo siendo éste un lugar abierto, con presencia de frondosos árboles, además que toda la zona está asfaltada, el fluido vehicular es más lento y la velocidad del viento es más baja. Asimismo, en el turno de la mañana (7-8 am) y en la noche (6-7pm) se tuvieron el

mayor número de bacterias aisladas del aire, mientras el menor número se tuvo en el turno de la tarde (2-3pm) con 490 cepas. Mientras, un estudio en Estados Unidos, muestra que la concentración de bioaerosoles en la atmósfera está en función de los ciclos diurnos, incrementa al amanecer, tiene su máximo al medio día, se disminuye en la tarde y en la noche se presentan las más bajas concentraciones de nueve de la noche a cinco de la mañana (Carvajal, 2016).

En Piura, se evaluó el promedio semanal de la concentración de material particulado menores a 10 micrómetros PM₁₀ en $\mu\text{g.m}^{-3}$ en las estaciones de la cuenca atmosférica de Piura, donde se registró los valores más altos en el Centro Recreacional CONAFOVICER y el valor más bajo se registró en el 2008 en la Municipalidad Provincial de Piura (Rivera, Sanchez, & Concepción, 2011). Esto se puede dar por la ubicación del Centro Recreativo CONAFOVICER que está situada al suroeste de la zona industrial y al sureste de la zona comercial, donde se tiene la influencia de estas dos fuentes antropogénicas, asimismo por constituirse en las zonas más expuestas a los vientos del suroeste que arrastran partículas desde fuentes naturales como el desierto de Sechura (Rivera, Sanchez, & Concepción, 2011). En este estudio de bacterias en el aire de la ciudad de Piura se tuvo parecidos resultados, el Centro Recreacional CONAFOVICER fue uno de los lugares con el mayor número de bacterias en el aire, en mayo llegó a tener la cantidad más alta con 3663 ufc/ m³, mientras el menor número de bacterias se tuvo en la Municipalidad Provincial de Piura en marzo con 398 ufc/m³.

CONCLUSIONES

- Se identificó *Pseudomonas aeruginosa*, *P. oryzihabitans*, *P. cichorii*, *P. putida* biovar A y *P. stutzeri* en el aire de tres puntos exteriores de la ciudad de Piura, entre los meses de marzo y septiembre del 2017.
- Se encontró una relación entre el nivel de iluminación y la cantidad de bacterias en el aire; mientras, no se encontró para temperatura, humedad relativa y velocidad del viento.
- Se conservaron las cepas de *Pseudomonas* identificadas en BHI con glicerol al 15%, que están depositadas en el laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Piura.

RECOMENDACIONES

Se recomienda a:

- Futuros investigadores científicos o tesistas, analizar la biología de las bacterias del aire con técnicas moleculares.
- Las autoridades competentes desarrollar un sistema de monitoreo de bacterias en el aire, y sus perfiles de resistencia a los antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanís, E., & Guerrero, I. (2004). *Pseudomonas* en Biotecnología. *Bio Tecnología*, 26-37.
- Álvarez, R., & Mesa, R. (2009). Correlación de microorganismos patógenos existentes en los ambientes intra y extramural presente en jardines infantiles más y menos influenciados por factores contaminantes ubicados en las localidades de Fontibón y Kennedy. Bogotá, Colombia. *Tesis*. Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Amigot, J., Ticio, T., González, J., Lara, C., Bárcena, C., & Rodríguez, A. (2000). An aerobiological study in the rural areas of Aragon (Spain) with a high population of pigs. *Grana*, 259- 265.
- Azhar, E., Papadioti, A., Bibi, F., Ashshi, A., Raoult, D., & Angelakis, E. (2017). *Pseudomonas saudimassiliensis* sp. nov. a new bacterial species isolated from air samples in the urban environment of Makkah, Saudi Arabia. *New Microbes and New Infections*, 43-44.
- Barriga, G., & Mercado, F. (2007). Microbios africanos de vacaciones en el Caribe . *Rev Mex Patol Clin*, 168-176.
- Britania. (2015). *Laboratorios Britania S.A.* Obtenido de <https://www.britanialab.com>
- Camacho, J. (2013). Las bacterias y sus extraños nombres. *Elementos*, 3-16.
- Carvajal, C. (2016). Evaluación del comportamiento de aerobacterias en el corregimiento de Cuatro Bocas. Tubará, Atlántico. *Tesis*. Universidad de la Costa, Medellin, Colombia.
- Castro, M. (2012). Estudio inicial de pseudomonas fitopatógenas aisladas de daños en plantas de estropajo, pino y tomate de cultivos veracruzanos. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Veracruzana, Veracruz, Mexico.

- Chamorro, A., D'Luis, R., & Pérez, C. (2017). Diversidad de bacterias endófitas aisladas de árbol de neem y su actividad inhibitoria contra el *Colletotrichum gloesporioides* causante de la antracnosis del ñame en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 48-54.
- Cruz, O., & Jiménez, P. (2006). Evaluación de la contaminación del aire por microorganismos oportunistas y su relación con material particulado (PM2.5 y PM10) en la localidad de puente Aranda. Bogotá, Colombia. *Tesis*. Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- De la Rosa, M., Mosso, M., & Ullán, C. (2002). El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. *Observatorio Medioambiental*, 375-402.
- Domínguez, I. (2014). Evaluación y control de comunidades microbianas en cuevas turísticas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Farías, E., Medina, R., & Chavarría, J. (2005). Neumonía nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. *Medicina Interna de México*, 368-79.
- Flores, T., Maricela, P., & Valenzuela, C. (2007). Estudio Aerobiológico de la Zona Aledaña al Relleno Sanitario “San Nicolás”, Municipio de Aguascalientes. . *Investigacion y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguas Calientes*, 13-18.
- García, M., & Uruburu, F. (2008). *La conservación de cepas microbianas* . Valencia .
- García, R., Solís, R., & Llacsa, L. (2016). Rol de los microorganismos activos, aislados de la rizósfera y filósfera en la propagación de las especies forestales *Tabebuia chrysantha* y *Tabebuia billbergii*, con fines de conservación y explotación comercial. Tumbes- Perú- 2014-2015. (*Tesis de Maestria*). Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes.
- Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 Part B. The Gammaproteobacteria*. Michigan : Springer.

- Gutiérrez, D., Hernández, A., & Corrales, L. (2009). *Pseudomonas oryzihabitans*: un microorganismo de creciente interés científico. *NOVA - Publicación Científica en ciencias biomédicas* - ISSN, 1-110.
- Guzmán, L. (2007). *Presencia de bacterias fitopatógenas en hortalizas y su relación con la inocuidad alimentaria*. Universidad Veracruzana- Instituto de Ciencias Básicas, Xalapa, Veracruz, (Tesis de grado), Mexico .
- Jacinto, M. (2013). Estudio de la diversidad de las bacterias aerotransportadas en la atmósfera baja de la zona metropolitana del valle de México. (*Tesis de grado*). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Kulkarni, D. (2017). Preliminary study of airborne microbiota in some areas of Amaravati city. *Life Science Informatics Publications*, 212.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Merck. (2014). *Mikrobiologie Bactident Oxidase* . Obtenido de Merck KGaA: <http://www.merck-chemicals.com>
- MINAM. (2010). *Servicio de consultoría para la asistencia técnica a municipios para la implementación de redes de monitoreo de la calidad del aire cuenca atmosférica de Piura*. Ministerio del Ambiente del Perú, Lima, Perú.
- Montero, M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- OMS. (27 de Febrero de 2017). *Organizacion Mundial de la Salud*. Obtenido de La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.:

<https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#>

OPS. (Enero de 2019). *Cuáles son los 10 principales amenazas a la salud en el 2019*. Obtenido de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1496:ten-threats-to-global-health-in-2019&Itemid=135&lang=es

Pearce, D., Bridge, P., Hughes, K., Sattler, B., Psenner, R., & Russell, N. (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiol Ecology*, 143–157.

Pérez, M., Cabrera, N., Batlle, M., & Estévez, R. (2002). Etiología bacteriana de las infecciones respiratorias agudas en pacientes VIH/SIDA. *rev cubana med trop*, 147-51.

Rey, R., & Fula, H. (2005). Evaluación de la contaminación del aire por microorganismos patógenos en los bioaerosoles, en una zona de alta actividad industrial y flujo vehicular de la localidad de puente Aranda en Bogotá D.C. *Tesis*. Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.

Rivera, J., Sanchez, O., & Concepción, E. (2011). Metodología para el diseño de una red de monitoreo para la calidad del aire. Aplicación para la ciudad de Piura. *Revista Peruana Geo-Atmósfera (RPGA)*, 95-103.

Rosas, I., Cravioto, A., & Ezcurra, E. (2004). *Microbiología Ambiental*. Mexico, D.F.: Priemra edición

Ruiz, C., Fernández, J., Campos, E., Michilot, K., Delgado, J., Pintado, J., & Carlos, D. (2017). Estudio preliminar de bacterias aerobias mesófilas del aire de las ciudades de Piura y Castilla, Perú, diciembre 2016 a mayo 2017. *ECIPerú*, 1-5.

Sánchez. (2013). Estudio molecular de poblaciones de *Pseudomonas ambientales*. *Tesis Doctoral*. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España.

- Sánchez, L., Zapata, M., Rodríguez, R., & Beaver, J. (2003). Distribución y patogenicidad de *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stap en el cultivo del café en Puerto Rico. *J. Agrie. Univ. P.R.*, 123-135.
- Silva, F. (2015). *Pseudomonas (Flavimonas) oryzihabitans*. *Rev Chilena Infectol*, 445-446.
- Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P., & De Vos, P. (2010). Análisis de *Pseudomonas* Fitopatógenas Usando Métodos Inteligentes de Aprendizaje: Un Enfoque General Sobre Taxonomía y Análisis de Ácidos Grasos Dentro del Género *Pseudomonas*. *Fitopatologia* , 1-16.
- Smith, D., Griffin, D., Jaffe, D., & Schuerger, A. (2012). Free Tropospheric Transport of Microorganisms from Asia to North America. *Microbial Ecology*, 973–985.
- Soto, R., López, M., Morales, N., Gonzáles, J., Oliva, P., & Dueñas, M. (2003). *Ocimum basilicum* L; nuevo hospedante en Cuba de *Pseudomonas cichorii*. *Fitosanidad*, 3-5.
- Soto, T., Lozano, M., Soler, J., Cansado, J., & Gápto, M. (2009). Microbiological survey of the aerial contamination in urban areas of the city of Murcia, Spain. *Anales de Biología*, 7-13.
- UCV. (2012). *Pruebas Bioquímicas: Productos químicos y biológicos para el diagnóstico*. Universidad Central de Venezuela (UCV)., Venezuela.
- Valderrama, S., Gonzáles, P., Caro, M., Ardila, N., Ariza, B., Fabián, G., & Carlos, Á. (2016). Factores de riesgo para bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano. *Biomédica* , 69-77.

ANEXOS

Anexo 1. Bacterias en la atmósfera.

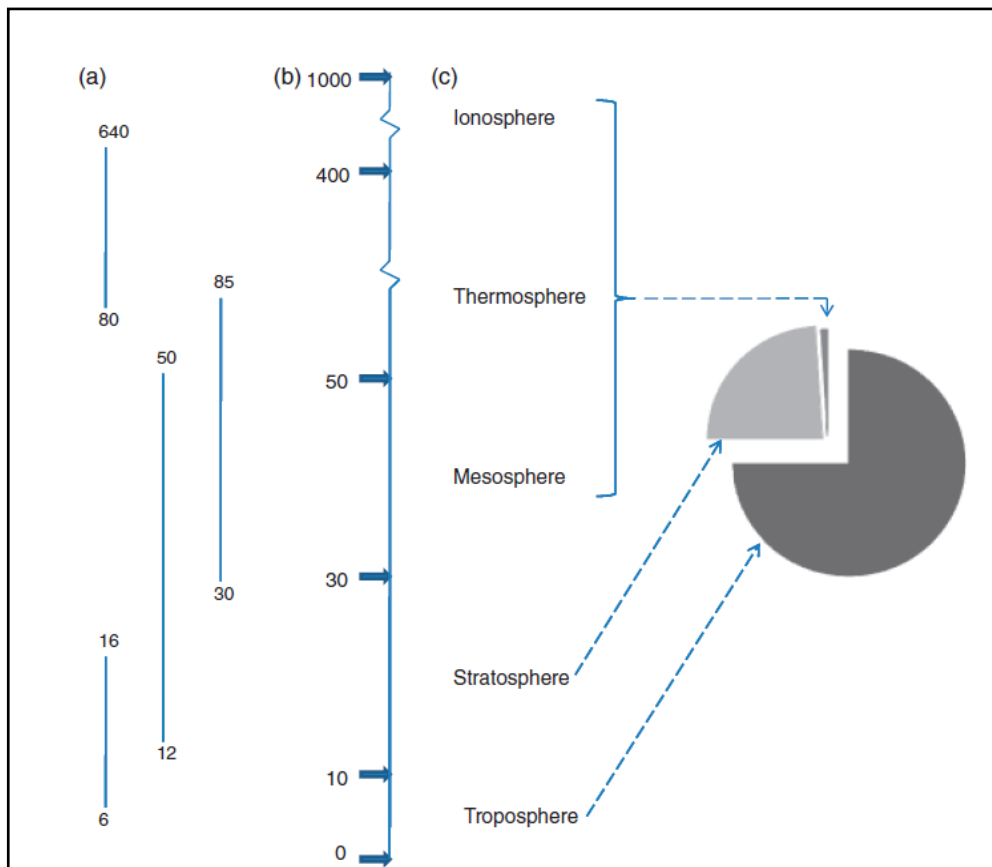


Figura 1. 1. Diagrama esquemático de capas dentro de la atmósfera que muestra (b) las alturas de diferentes capas en kilómetros y (c) la proporción de microorganismos aéreos que se encuentran en cada una de las capas atmosféricas.

Fuente: Microorganisms in the atmosphere over Antarctica (Pearce, y otros, 2009).

Anexo 2. Interpretación de la prueba oxidación/fermentación.

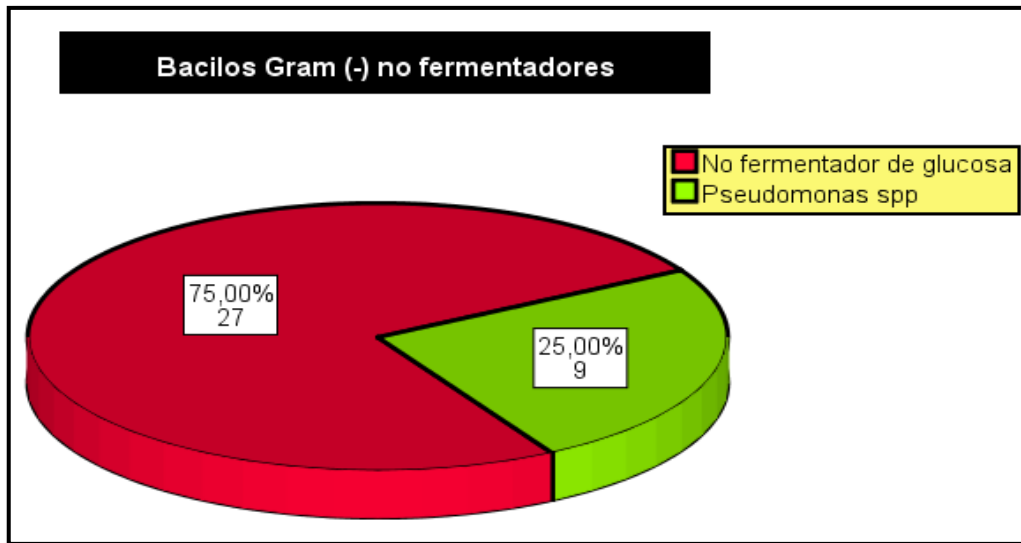
Reacción	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo cubierto (sellado)
Oxidación (O, Ox)	Abierto	Amarillo (A) ^a	Verde
Fermentación (F)			
Anaerógena	Cubierto	Amarillo (A)	Amarillo (A)
Aerógena	Cubierto	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
Ni fermentación ni oxidación (NR, -)	Ninguno ^b	Azul o verde (-)	Púrpura (-)
Fermentación y oxidación (O + F, O/F)	Ambos	Amarillo (A o AG)	Amarillo (A o AG)

^aA: producción de ácido

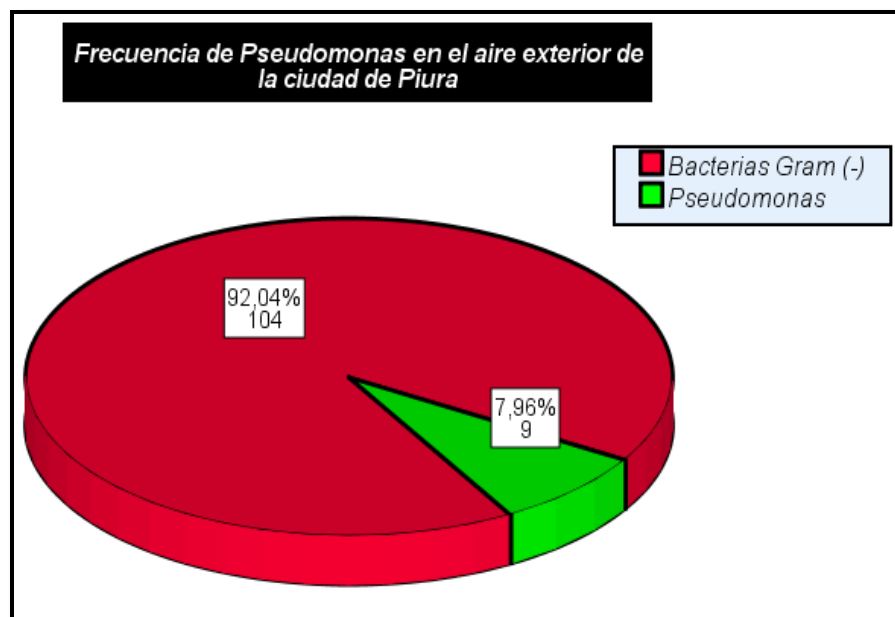
^bLectura de control del hidrato de carbono no inoculado; sin cambios de color.

Fuente: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003)

Anexo 3. Porcentajes de *Pseudomonas*.



Grafica 3.1. Porcentaje de *Pseudomonas* en los bacilos negativos no fermentadores.



Grafica 3.2. Porcentaje de *Pseudomonas* en las bacterias Gram negativas.

Anexo 4. Distribución de las UFC/ m³ por mes y lugar en el aire de la ciudad de Piura.

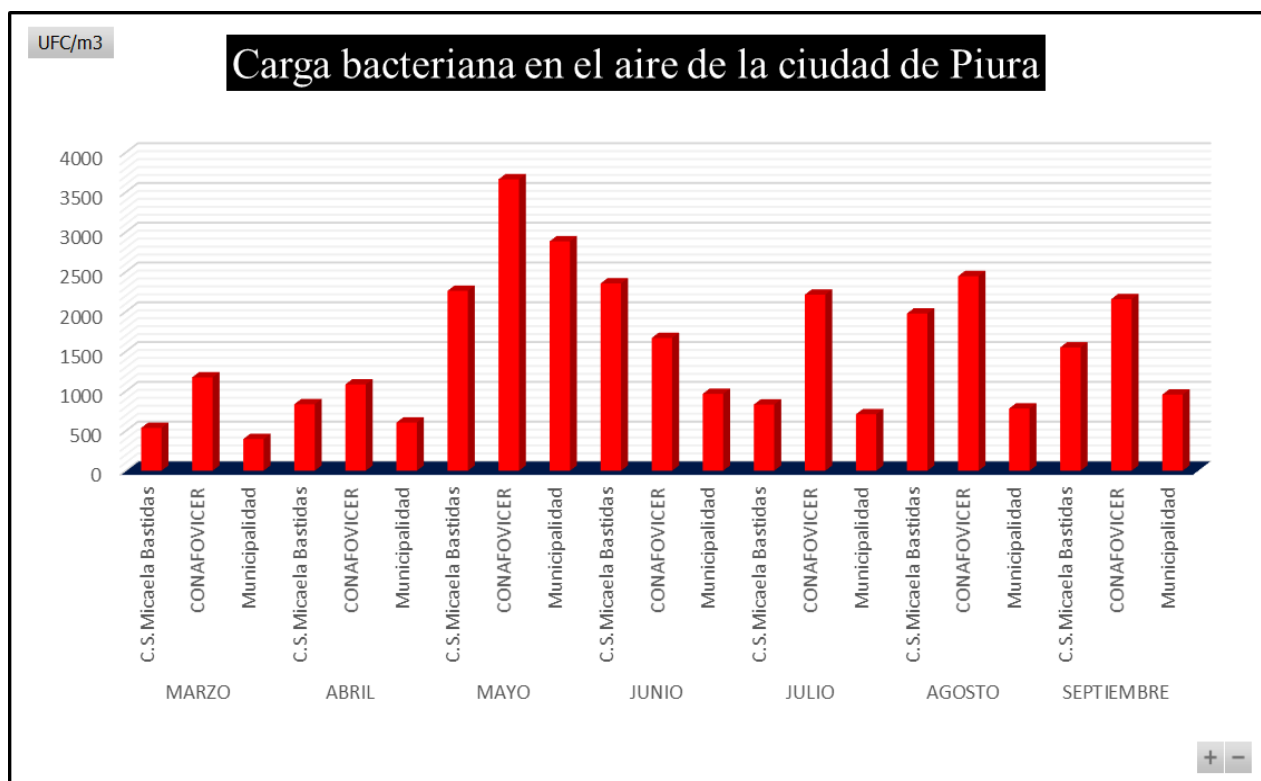


Grafico 4. 1. Carga bacteriana en el aire de la ciudad de Piura entre marzo y septiembre del 2017.

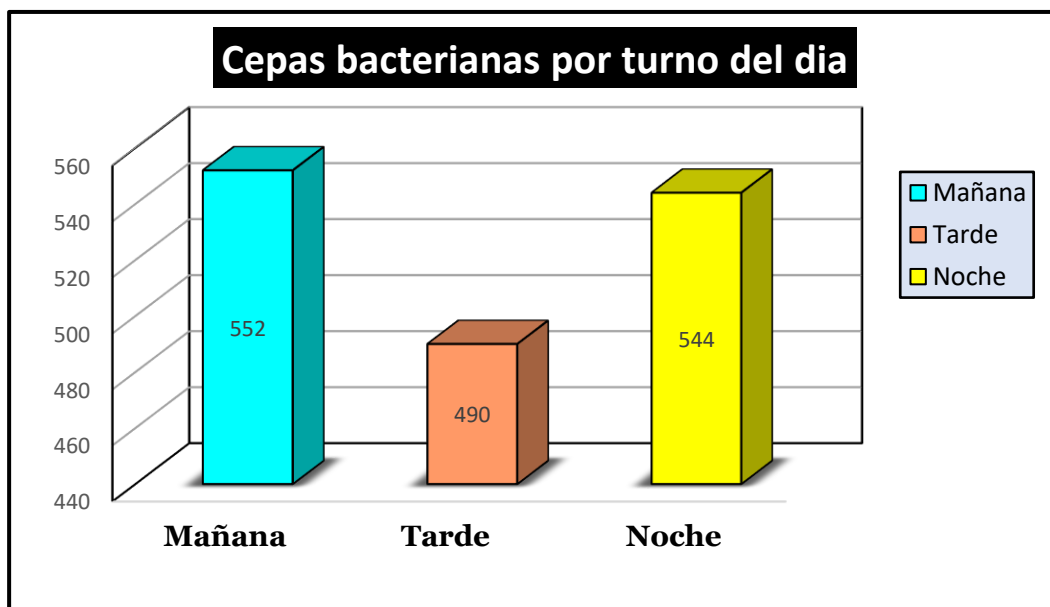


Grafico 4. 2. Distribución del número de cepas bacterianas en el aire, por turno.

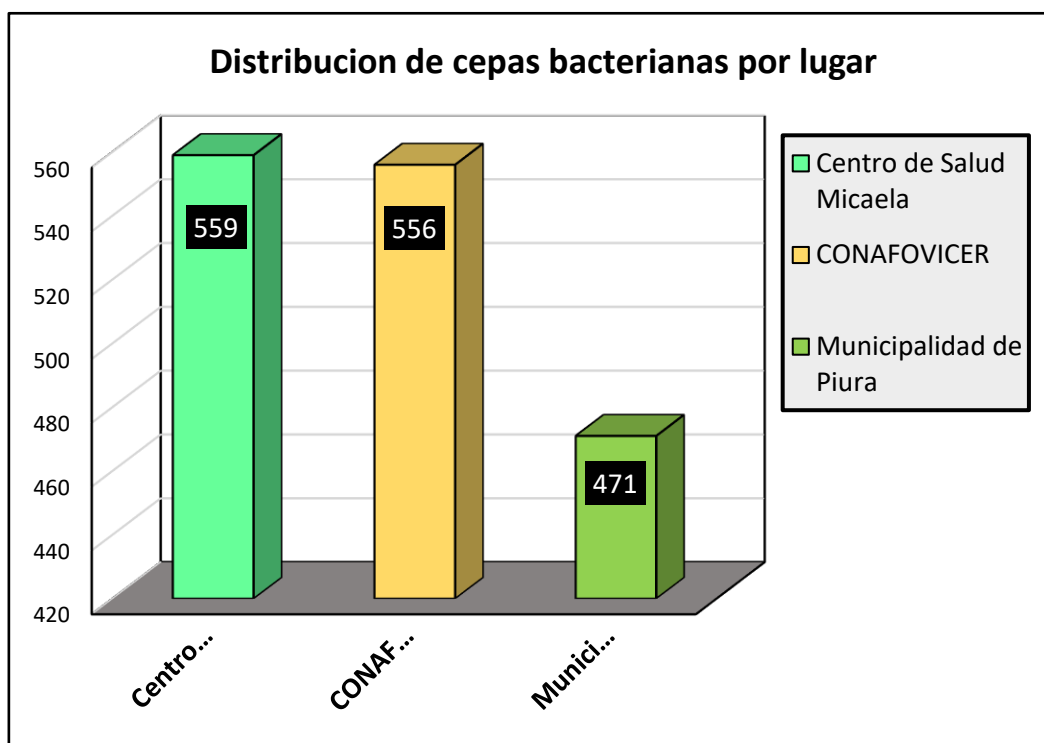
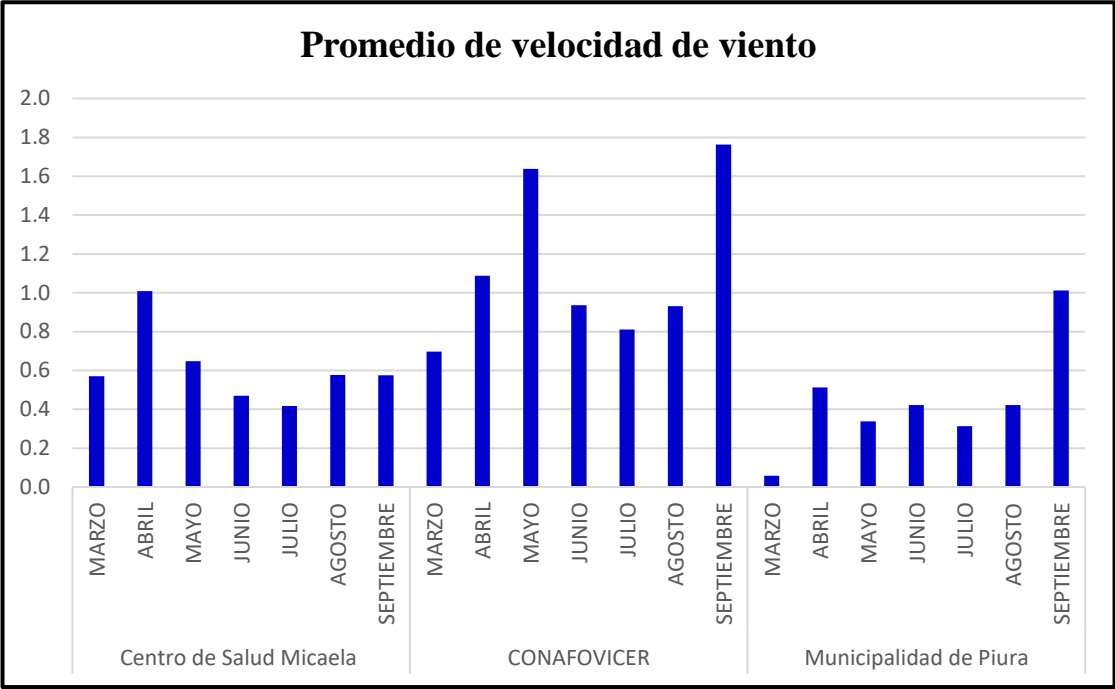
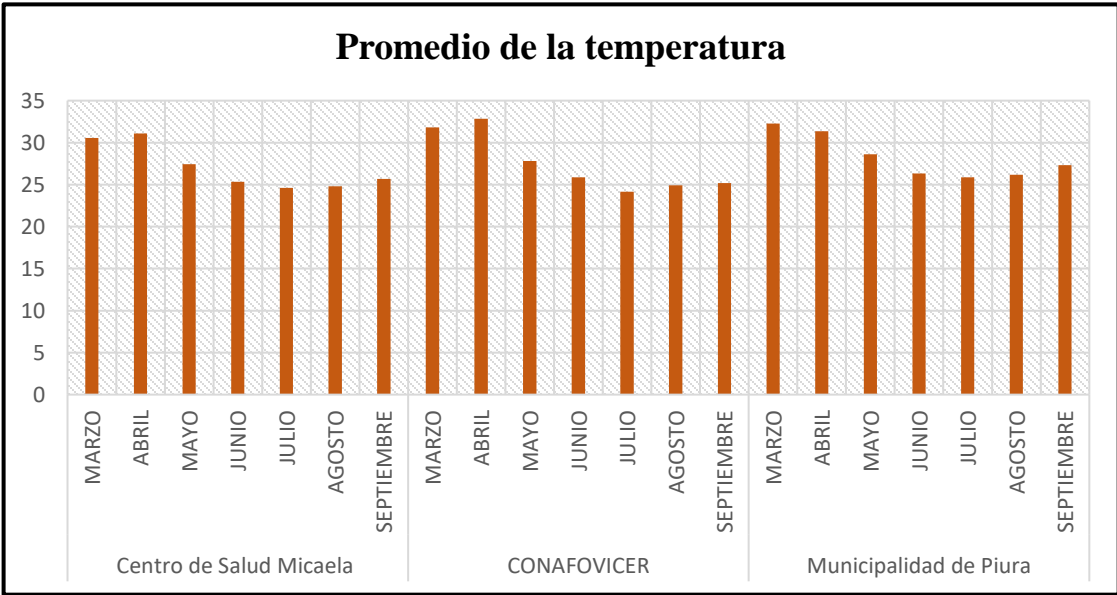


Grafico 4. 3. Distribución del número de cepas bacterianas en el aire, por lugar.

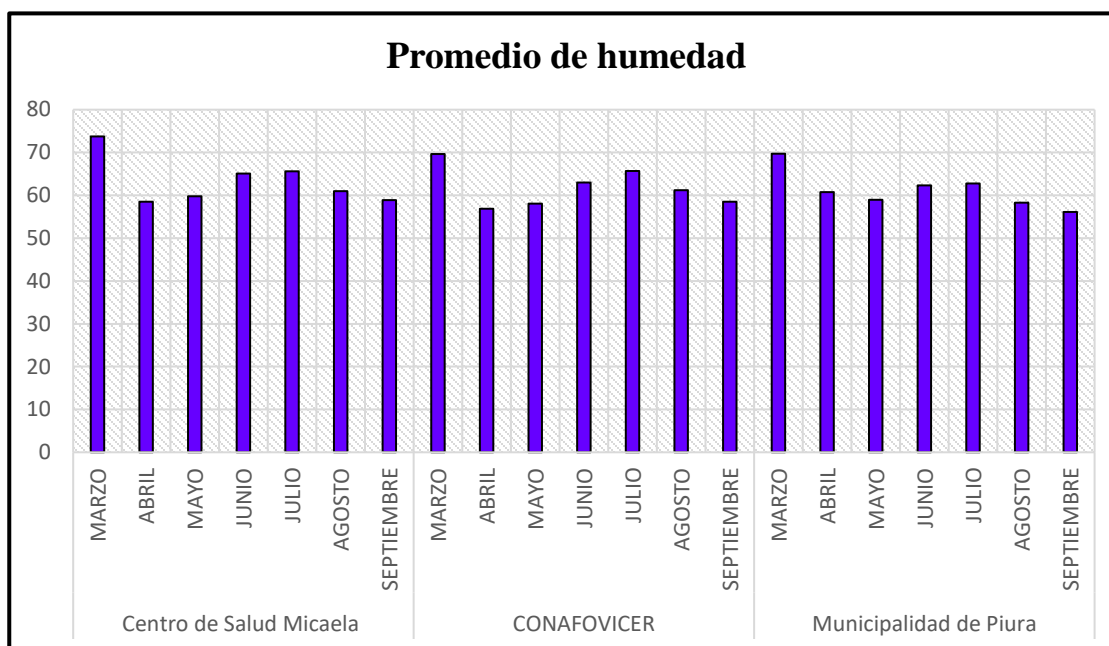
Anexo 5. Datos ambientales que se tomaron durante el muestreo.



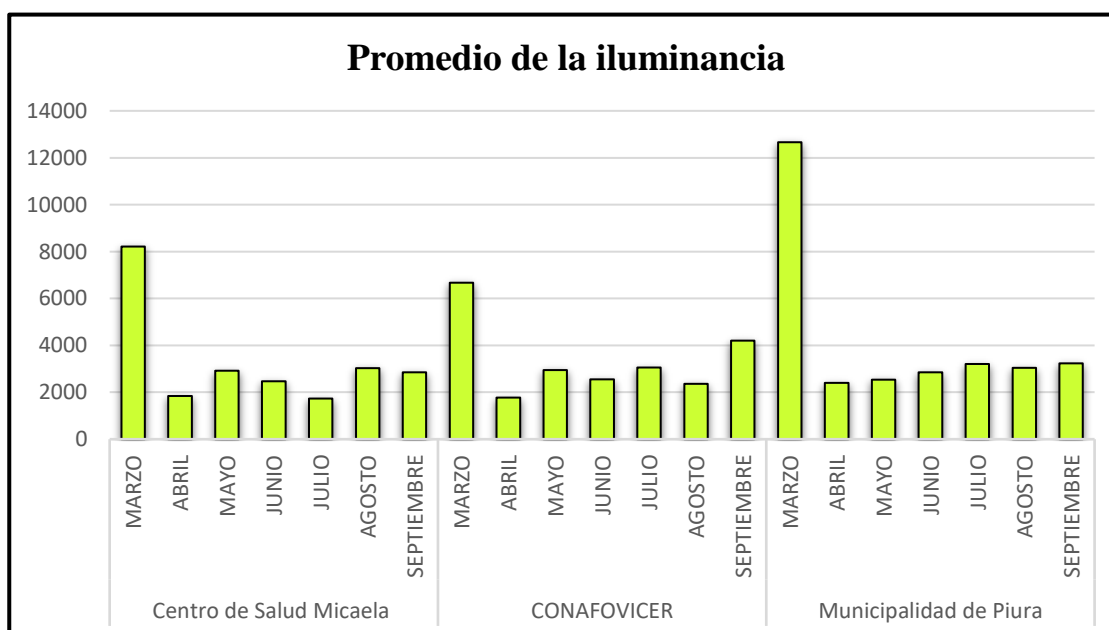
Grafica 5.1. Promedios de velocidad de viento en las tres zonas de muestreadas.



Grafica 5.2. Promedios de temperatura en las tres zonas muestreadas



Grafica 5.3. Promedios de humedad de las tres zonas muestreadas.



Grafica 5.4. Promedios del nivel de iluminación en las tres zonas muestreadas.

Anexo 6. Identificación bioquímica de *Pseudomonas*.

Tabla 6.1. Pruebas bioquímicas para especies de *Pseudomonas*

PRUEBA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. chloroaphis</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fluorescens biovar I</i>	<i>P. fluorescens biovar II</i>	<i>P. fluorescens biovar III</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃ - NO ₂	+	-	NR	NR	+	+	+
N° de flagelos	1	1	>1	>1	>1	>1	>1
4 °C	NG	NR	G	NG	G	G	G
41 °C	G	G	NG	NG	NG	NG	NG
MacConkey (MAC)	G	G	G	G	G	G	G
Hidratos de carbono							
Glucosa	A	-	A	A	A	A	A
Inositol	-	-	A	V	A	A	A
Trehalosa	-	-	A	-	A	A	A
Otras pruebas							
Arginina deshidrolasa	+	+	+	-	+	+	+
Hidrólisis de la esculina	-	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de la gelatina, 22 °C	+	V	+	-	+	+	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Lecitinasa	-	-	V	+	+	1 ^w	+
Lipasa	+	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-
G, crecimiento; NG, sin crecimiento; NR, no se dispone de resultados; A, producción de ácido (+); V, reacciones variables; w, reacción débil.							

Fuente: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica

(MacFaddin, 2003)

Tabla 6.1. Pruebas bioquímicas para especies de *Pseudomonas* (continuación).

PRUEBA	<i>P. fluorescens</i> biovar IV	<i>P. fluorescens</i> biovar V	<i>P. gelidicola</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i> subes. <i>pseudoalcaligenes</i>	<i>P. putida</i> biovar A	<i>P. putida</i> biovar B	<i>P. saccharophila</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. viridiflava</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NO ₃ - NO ₂	+	+	NR	+	+	V	V	NR	+	NR	NR
No. De flagelos	>1	>1	>1	1 ^a	>1	>1	>1	1	1	>1 ^a	1- 2
4 °C	G	V	NG	NR	NR	V	G	NR	NR	V	NR
41 °C	NG	NG	G	G	G	NG	NG	NG	V	NG	NG
MacConkey (MAC)	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Hidratos de carbono											
Glucosa	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A
Inositol	A	A	A	-	-	-	-	-	-	V	A
Trehalosa	A	A	A	-	-	-	-	A	-	-	-
Otras pruebas											
Arginina deshidrolasa	+	+	-	+	V	+	+	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de la gelatina, 22 °C	+	+	+	-	V	-	-	+	-	V	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecitinasa	+	V	+	-	NR	-	-	NR	-	V	V
Lipasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
G, crecimiento; NG, sin crecimiento; NR, no se dispone de resultados; A, producción de ácido (+); V, reacciones variables; w, reacción débil.											
^a Flagelos laterales de longitud corta pueden ser producidos en ciertas condiciones.											

Fuente: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003)

Anexo 7. Otras especies de bacterias identificadas en el aire de Piura.

7.1. Tabla Identificación de bacterias del aire exterior de la ciudad de Piura.

Otras bacterias identificadas
<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Alcaligenes sp</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
<i>Proteus mirabilis</i>

Anexo 8. Confirmación de la identificación bioquímica a través del MicroScan.

Datos almacenados en la base de datos de LabPro																							
Biotipo:		01120600																					
Microorganismo:		P. oryzihabitans																					
Resultados bioquímicos: (Los resultados que aparecen en negrita y <u>subrayados</u> son atípicos para el microorganismo almacenado)																							
URE	-	LYS	-	TDA	-	CIT	-	TAR	-	OF/G	+	CL4	-	NIT	-	ADO	-	GLU	-	RAF	-	SUC	-
H2S	-	ARG	-	ESC	-	MAL	+	ACE	-	P4	+	FD64	-	OXI	-	ARA	-	INO	-	RHA	-		
IND	-	ORN	+	VP	+	ONPG	-	CET	-	K4	-	TO4	-			CF8	+	MEL	-	SOR	-		
Resultados de CIM: (Los antimicrobianos marcados con "Ø" están suprimidos en el Informe Largo y Corto de Paciente)																							
A/S	AK	AM	AUG	AZT	CAZ	CAZ/CA	CF	CFT	CFT/CA	CFX	Ø CL	CP	CPE	CRM									
<=8/4	<=16	<=8	<=8/4	<=1	4	<=0.25	>16	<=1	<=0.5	<=8	NR	<=1	<=1	<=8									
	S			S	S			S				S	S										
ETP	FD	FOS	GM	IMP	LVX	MER	NA	NXN	P/T	T/S	Ø TGC	TO											
<=0.5	64	<=64	<=4	<=1	<=2	<=1	<=16	<=4	<=16	<=2/38	NR	<=4											
			S	S	S	S			S	S		S											
P adicional:		ESBL ...																					

Figura 8.1. Identificación bioquímica por el sistema de MicroScan de *Pseudomonas oryzihabitans*.

Anexo 9. Fotografías.

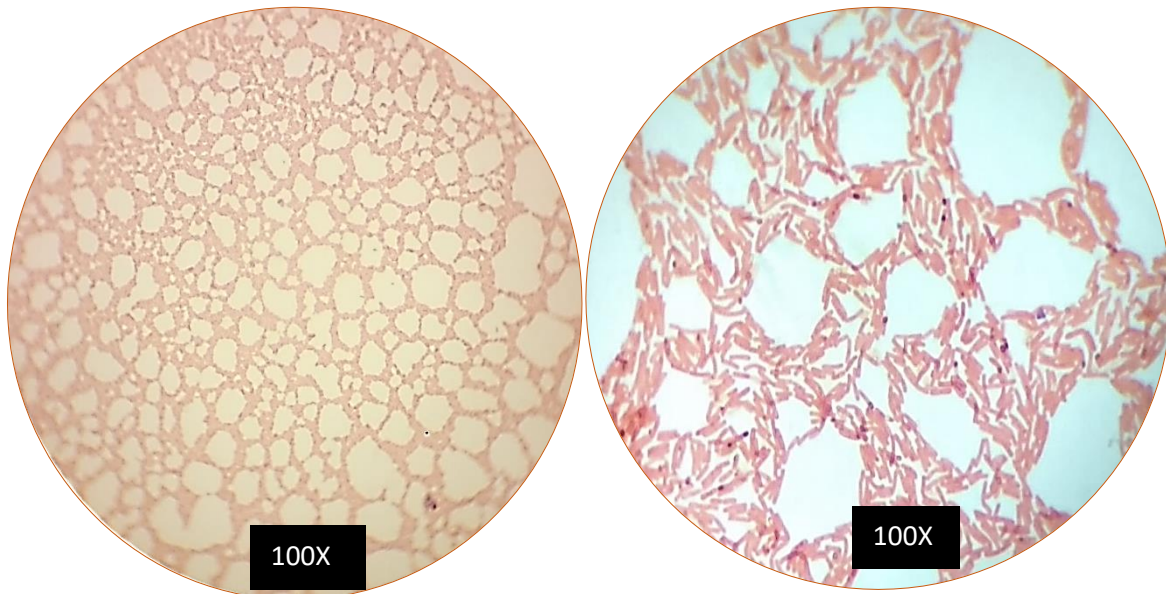


Figura 1. Tinción de Gram, bacilos Gram negativos.

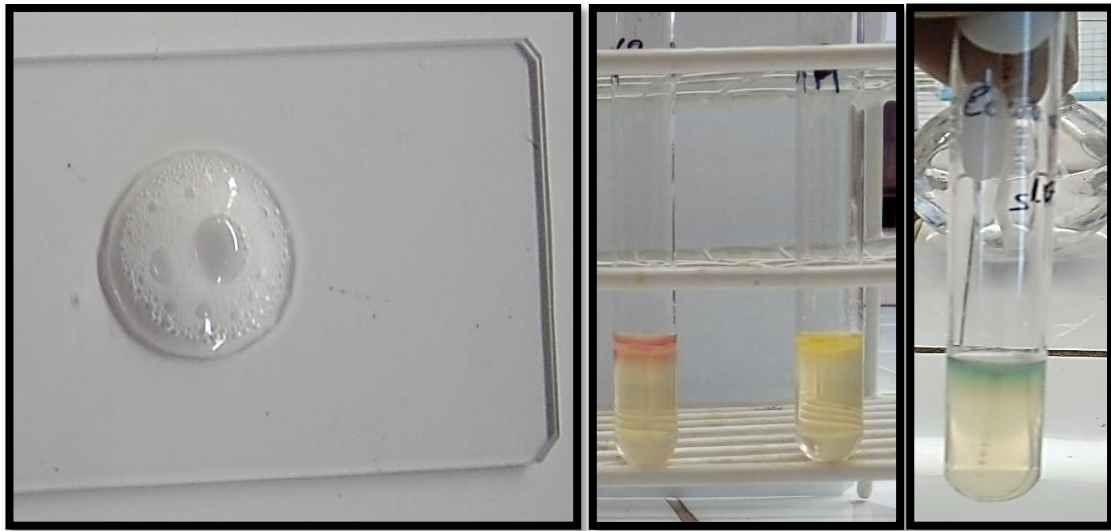


Figura 2. Izquierda prueba de catalasa y derecha prueba de SIM y Edwards- Ewing.



Figura 3. Prueba de fermentación de glucosa, inositol y maltosa; sin vaselina y con vaselina estéril (anaerobiosis). Cuando existe fermentación el medio se vuelve amarillo y se vuelve de color rojo cuando no hay fermentación.



Figura 4. Crecimiento en agar MacConkey.



Figura 5. (A) Prueba de TSI, (B) prueba de bilis esculina

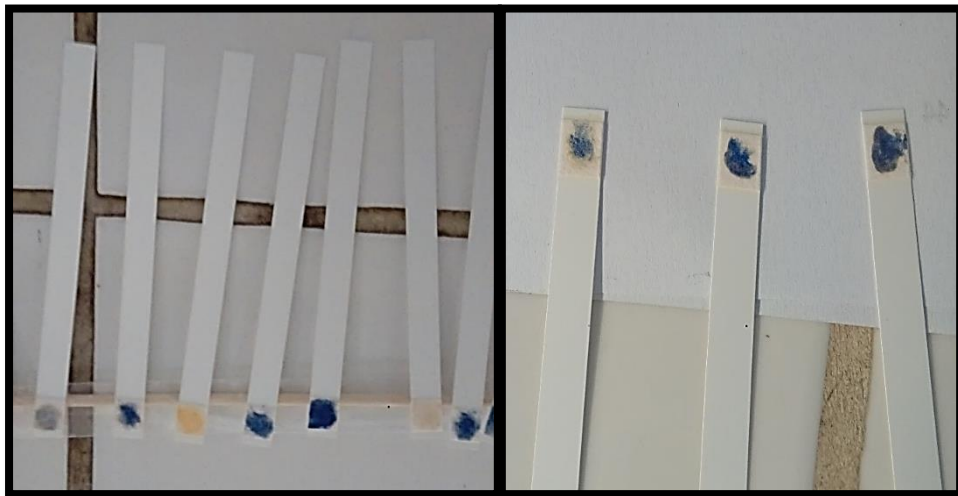


Figura 6. Prueba de oxidasa, tiras con el reactivo de oxidasa, reacción positiva, color azul violeta; reacción negativa, color amarillo.

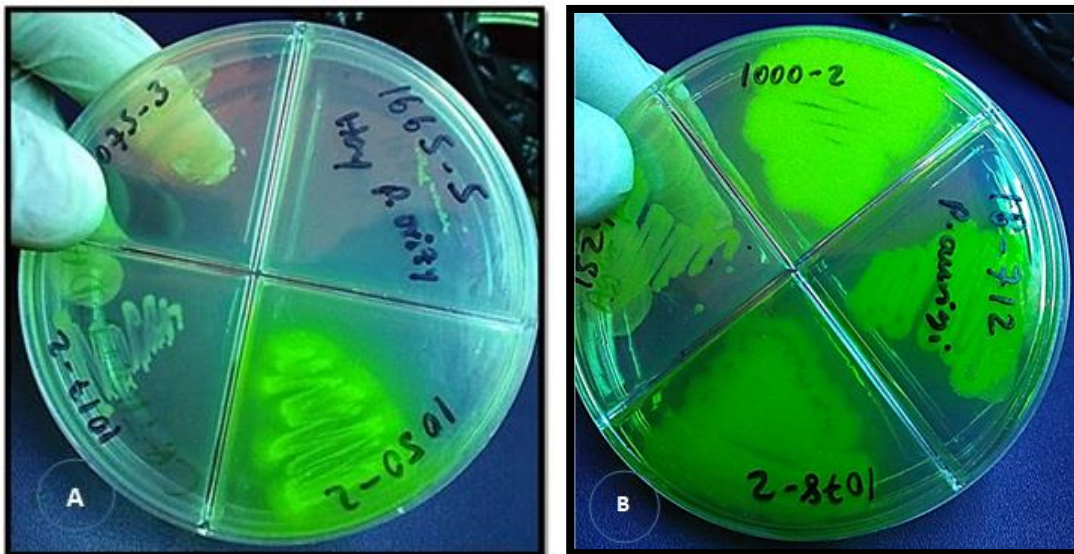


Figura 7. (A) Cepas de *Pseudomonas* en medio cefrimida y (B) en medio pseudomona F

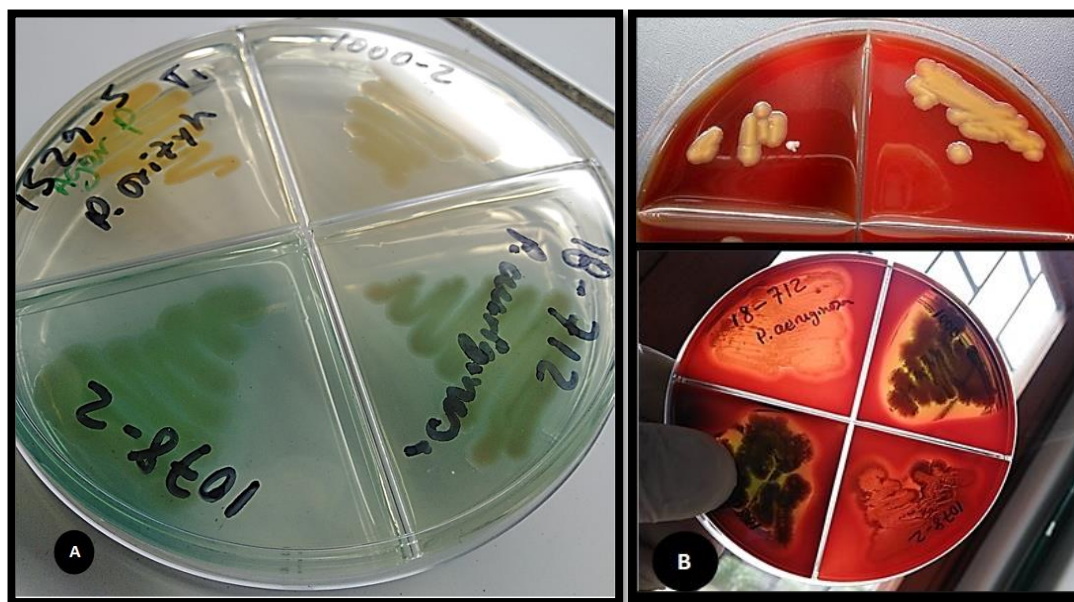


Figura 8. (A) Cepas de *Pseudomonas* en medio pseudomona P y (B) en medio agar sangre.



Figura 9. (A) Foto superior, arginina dehidrolasa positiva; inferior, ornitina descarboxilasa negativa
(B) izquierda, prueba de citrato de Simmons positiva; en la derecha, citrato de Simmons negativa.



Figura 10. (A) Extracción de pigmento con cloroformo, izquierda prueba negativa, derecha prueba positiva; (B) parte superior prueba de gelatinasa, parte inferior prueba de hidrólisis de almidón.

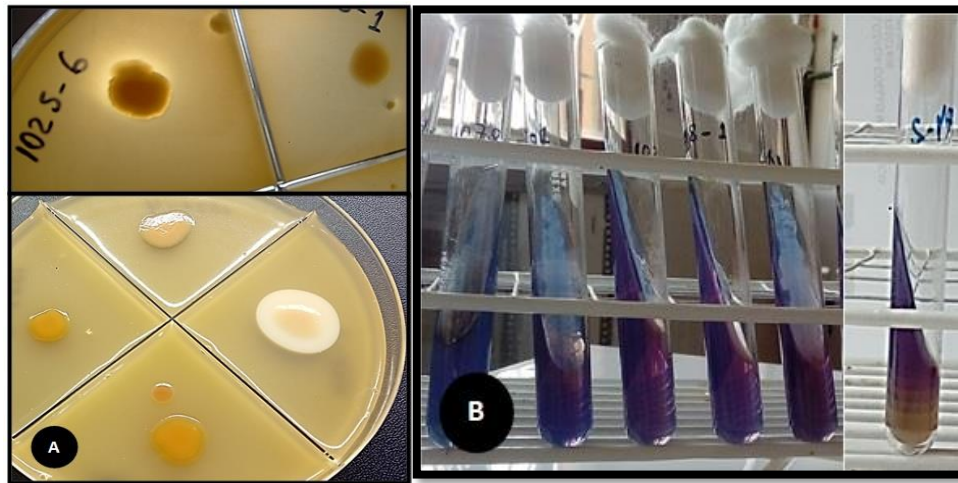


Figura 11. (A) Superior: prueba de lipasa; inferior: prueba de lecitinasa. (B) prueba lisina descarboxilasa en medio LIA.

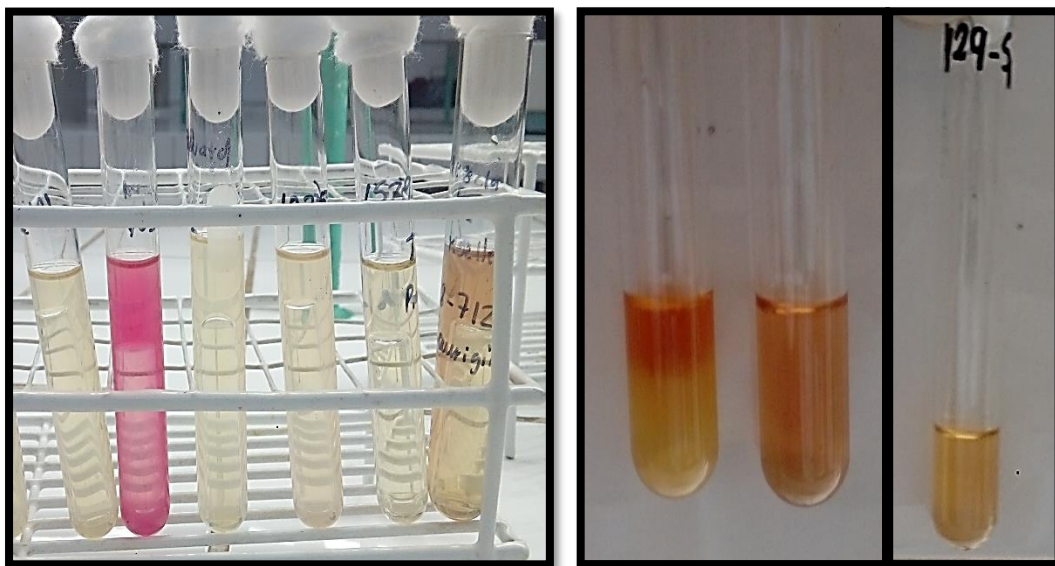


Figura 12. En la izquierda prueba de $\text{NO}_3\text{-NO}_2$, derecha prueba de MRVP.

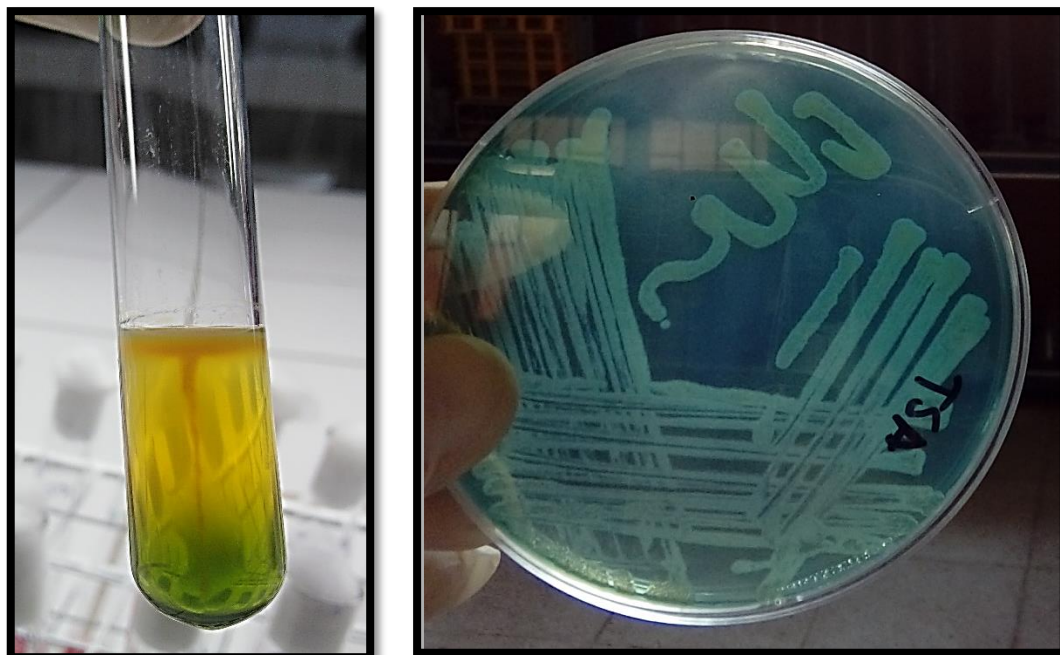


Figura 13. En la izquierda prueba de O/F, en la derecha *P. aeruginosa* en medio TSA.



Figura 14. Conservación de cepas de *Pseudomonas* en BHI con glicerol al 15%.